平成 19 年度成果報告

知的基盤創成・利用促進研究開発事業

臨床検査用標準物質の研究開発

平成 20 年 5 月

（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構

委託先　（独）産業技術総合研究所

成 果 報 告 書 目 次

１．事業目的および成果の概要 1
１-１　事業目的 1
１-２　事業概要 2
１-３　成果の概要 4
１-４　目的に照らした達成状況 4
２．成果の詳細 6
２-１　標準化基本検討委員会 6
２-１-１　目的 6
２-１-２　委員会構成 6
２-１-３　活動総括 7
２-２　実試料系標準物質の研究開発 9
２-２-１　総　括 9
２-２-２　実施態勢 17
２-２-３　各　論 20
２-２-３-１　グリコアルブミン 20
２-２-３-２　ヘモグロビン　A1c　（HbA1c） 26
２-２-３-３　血清鉄 37
２-２-３-４　尿素窒素 44
２-２-３-５　インスリン 48
２-２-３-６　C ペプチド 60
２-２-３-７　コルチゾール 72
２-２-３-８　HDL コレステロール、LDL コレステロール 84
２-２-３-９　測定用常用参照および実用血清標準物質（アルブミン） 99
２-２-３-１０　アルブミンの常用基準測定法 116
２-２-３-１１　尿アルブミン 124
２-２-３-１２　膵型アミラーゼ 133
２-２-３-１３　血清　C 反応性蛋白（CRP） 147
２-２-３-１４　リパーゼ 157
２-２-３-１５　尿中電解質成分　(Na, K, Cl) 175
２-２-３-１６　尿中生化学成分　(Ca, Mg, UA, UN, Glu, Cre, iP) 180
２-２-３-１７　尿中アミラーゼ 189
２-２-３-１８　血清無機リン 193
２-２-３-１９　血清リチウム（　Li） 197
２-２-３-２０　HDL-および LDL-コレステロール測定用血清標準物質 206
２-２-４　国際標準化への対応 212

２-３　純物質系標準物質の研究開発　214
２-３-１　研究背景　214
２-３-２　研究担当者　214
２-３-３　　C 反応性蛋白　215
２-３-４　アルブミン　226
２-３-５　コルチゾール　230
２-３-６　今後の課題　235
２-４　参考検討結果・・・実試料系標準物質の調査研究の検証　236
２-４-１　総　括　236
２-４―２　各　論　238
２-４―２-１　血清抗核抗体　(ANA)　238
２-４-２-２　リウマチ因子　(RF)　253
２-４-２-３　黄体形成ホルモン　(LH)　272
２-４-２-４　卵胞刺激ホルモン　(FSH)　301
２-４-２-５　エストラジオール（　E2）　322
２-４-２-６　フリーＴ４　347
２-４-２-７　β２-マイクログロブリン　384
２-４-２-８　　FDP・D ダイマー　409
３．外部発表、講演等　420
４．謝　辞　424

まえがき

本研究は平成 17～19 年度の間に（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）「知的基盤創成・利用促進研究開発事業」の委託事業として実施したものである。

臨床検査は一般的な健康診断や病院での初期診断検査として国民の関心が高い分野であり、特に最近ではメタボリックシンドローム（代謝症候群）診断が国民的な関心事となり、厚生労働省を中心に当該診断に関する全国統一の指針を策定したところである。なかでも、臨床検査データの標準化は個人の検査データに普遍性を付与し、健康管理データとして継続的な利用を可能にする点から、国民の健康や医療に直接的に貢献する分野である。臨床検査の標準化に関する活動は、これまでにも関係する諸学協会の努力によってさまざまな分野で進められ、臨床検査の進歩に大きな成果を挙げてきた。一方、近年の人的および物的交流、情報交流さらには研究交流がグローバル化することにともない、臨床検査分野においても測定方法や測定結果の標準化が世界的な規模で必要とされるようになった。具体的には、2006 年から EU において体外診断薬に関する指令（In Vitro Diagnostic Medical Devices: IVDMD 指令）が発効さ、臨床検査における測定方法の妥当性と測定結果の信頼性の保証、すなわちトレーサビリティの確保が求められる時代へ入った。このため、世界各国の臨床検査関連産業は、臨床検査結果の信頼性と互換性を確保するために自らトレーサビリティを確保するために必要な標準物質を開発するとともに、トレーサビリティソースとして必要な国家計量標準としての標準物質の開発と供給を必要とするようになった。2002 年 6 月には国際度量衡委員会（CIPM）と国際臨床化学連合（IFCC）の合同委員会「検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会 (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine: JCTLM)」が設置され、臨床検査分野における純物質系標準物質および高位の実試料系標準物質の整備が欧米日を中心に進められている。

本研究は、上記のような臨床検査に関わる国内的および世界的な潮流のもとで、極めてタイムリーに始められた。本研究では臨床検査に係わる産学官の研究者の参加を得て、初診時に必須な検査項目や臨床側より要望の高い検査項目について、末端ユーザーから高位標準物質までのトレーサビリティ体系を構築することを目的として、実試料系標準物質および純物質系標準物質の研究開発を行っている。同時に、現時点では高位標準物質の開発が難しい項目については、問題点の把握と開発の見通しを得ることを目的として調査研究を行っている。本研究開発により、数量的にも実効的な標準物質を迅速に整備するとともに、臨床の現場から国際単位系にまで遡及できる理想的な臨床検査のトレーサビリティ体系を社会に示すことで、臨床検査分野における計量的な意味での標準化が確立されることを願う次第である。

平成 20 年 5 月

研究代表者　　千葉　光一
（独）産業技術総合研究所　計測標準研究部門

件名：平成 19 年度成果報告書　知的基盤創成・利用促進研究開発事業　　「臨床検査用標準物質の研究開発」

本研究は、臨床検査で行われる基本的な項目について、末端の検査機関で用いられる標準物質から高位標準物質までのトレーサビリティ体系を構築することを目的とする。これにより、医療計量及び医療検査機械システムで得られる臨床検査データに科学的（計測学的）な信頼性を付与し、また、臨床検査データの互換性が空間的にも（何処でも）、時間的にも（いつでも）確保できるようになることが期待される。すなわち、臨床検査データに関して、医療の基礎情報としての信頼性が向上し、また、個人の健康管理データとしての連続性が確保されるようになることが期待できる。具体的には、国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指し、初診時に必須な検査項目と内分泌疾患の病態識別、循環器系疾患や糖尿病患者の治療の判断に必須な項目等から 20 種類程度の重要な項目からを選択して、3 年間で実試料系標準物質の開発を行った。また、現在、認証標準物質が開発されていないために、トレーサビリティ体系が確立されていない純物質系蛋白質を中心に、３種類程度の純物質系標準物質の開発を実施した。さらに、現時点ではすぐに高位の標準物質の開発が困難な検査項目について、標準物質の候補となる製造業者の校正物質の調査を行い、それらの中から共同実験により標準物質の候補となる校正物質の選定を行った。実試料系標準物質に関しては、ヘモグロビン A1c 実試料系標準物質について不確かさの評価実験と国際的な共同実験による認証値の設定を行い、JCTLM データベースにノミネートした。グリコアルブミン、血清鉄、尿素、コルチゾール、インスリン、C-ペプチド、尿中アミラーゼ、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、血清 C 反応性蛋白(CRP)については実試料系標準物質のプロトタイプを作製し、反応特性と日常検査法との互換性試験を実施し、標準物質に必要な性状を明らかにした。今後、HDL-および LDL-コレステロール、グリコアルブミンについては標準物質を作製し、来年度以降の JCTLM データベースにノミネーションを行う予定である。尿中ナトリウム・カリウム・塩素・マグネシウム・カルシウム・尿酸・尿素窒素・クレアチニン・グルコース・無機リン、血清無機リン・リチウムについては、実試料系標準物質候補に関して安定性の評価を行い、尿用標準物質としての開発を可能とした。アルブミン、膵型アミラーゼについては実試料系標準物質の値付けを実施した。リパーゼについては、各社試薬での共同実験をもとに、標準物質に必要な特性や調製方法を決定した。また、純物質系標準物質に関しては、C 反応性蛋白の純物質系標準物質(標準液)について認証作業が終了し、認証標準物質としての供給が可能となった。C 反応性蛋白は来年度の JCTLM にノミネーションする予定である。アルブミンの純物質系標準物質については値付けのための基準測定法を確立した。コルチゾールの純物質系標準物質に関しては、値付けの基準とする高純度標準物質および供給用の候補品の調製方法を決定するとともに、値付けのための測定方法を確立し、目標の不確かさ 1%以内での値付けの見通しを得た。一方、実試料系標準物質の調査研究に関しては、平成 17 年度および 18 年度で標準物質が作製可能と判断した項目について、実験計画書および標準物質候補品を作製し、検証実験を行った。このうち E2、LH、FSH、FT4、β２-マイクログロブリンについては、プール血清（抗原未添加）が有効という結果を得た。

Title : Research and Development to Promote the Creation and Utilization of an Intellectual Infrastructure. Development of Reference materials for Laboratory Medicine (FY2007) Final Report

There is a great demand to establish the metrological traceability system to higher order reference materials from routine measurement data in the IVD-MD (*in vitro* diagnostics and medical devices) in the clinical medicine, because the clinical testing data, which are obtained with different reagents and/or measurement procedures in different laboratories, are not always comparable with each other. The comparability with the clinical testing data allows the effective use of the data in nationwide, the improving medial treatment and consultation based on the data, and the long term record of the individual clinical laboratory data. It is the traceability that ensures the comparability among the clinical testing data obtained from different laboratories. In this study, several types of reference materials for laboratory medicine have been developed in order to establish the traceability. Firstly, about 20 kinds of matrix reference materials as secondary reference materials, which are very important for diagnostic of first medication, endocrine disease, coronary disease, diabetes and so on, are going to be developed in 3 years. In 2007, development of 20 matrix type of reference materials were carried out and 3 pure substance type of certified reference materials were investigated. Among the matrix type of reference materials, hemoglobin A1c (HbA1c) was completed to be characterized by international collaborative experiment and to be estimated its uncertainty. It has already been nominated to the JCTLM Database. In the case of 10 analytes such as glycoalbumin, iron in serum, urea, cortisol, insulin, C-peptide, amylase in urine, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, and C reactive protein (CRP) in serum, we developed their prototype of matrix reference materials and investigated their response characteristics and comparability when they were used as traceability sources of routine measurement procedures. In the case of urine containing elements (sodium, potassium, chlorine, magnesium, calcium, urea, nitrogen of urea, creatinine, glucose and inorganic phosphorus) and inorganic phosphorus and lithium in serum, we selected the candidate reference materials and evaluate their stabilities as a reference material. The matrix type of reference material of urine can be produced according to the protocol obtained in this study. The matrix reference materials of albumin and amylase were characterized. As for lipase, preparation method of reference material was decided through collaboration experiment among participating manufacturers. In the next financial year, the reference materials of HDL-and LDL-cholesterol and glycoalbumine will be nominated to the next cycle of JCTLM Database. On the other hand, in the case of pure substance type of certified reference materials (CRM), whole the development and certification process of the C reactive protein (CRP) in buffer solution CRM was completed and it is available to be disseminated to the market. It will be nominated to the JCTLM Database in the next year. As for the albumine CRM, the definitive method for characterization was developed. As for the cortisol CRM, the high purity primary reference material (PRM) was selected, the preparation method of candidate CRM was developed, and the definitive measurement method of characterization was established. The coltisol CRM will be developed with uncertainty less than 1%. In the feasibility study on screening tests reference materials, it found to be

very useful to use pool serum samples as a control material for E2, LH, FSH, FT4, and β2-microglobulin by the collaborative experiment among the participating manufacturers.

１．事業目的および成果の概要

１-１　事業目的

健康診断や病院などの医療機関で行われる血液や尿等の臨床検査は、個人の健康管理、医学の基礎データ、医学研究の基本情報である。しかしながら、医療計量や医療検査機械システムにより得られる検査データは、測定機器間、測定方法間、検査機関間において相互に互換性が確保されていないのが現実である。このため、診断に用いる臨床検査データの基準値が病院ごとに異なる、あるいは個人の健康診断や臨床検査データの継続性が保てないなどの問題が存在し、膨大な臨床検査データが有効に活用されていないと考えられている。

本研究開発では、医療計量及び医療検査機械システムにおける測定結果を科学的に信頼性のあるものにし、かつ、検査機関間での互換性を持たせるため、基本的な臨床検査項目について高位標準物質から末端の検査機関で用いられる標準物質までのトレーサビリティ体系を構築することを目的とする。

すなわち、臨床検査データに計測科学的な信頼性を付与することにより、検査機関が異なっても測定されるデータの互換性を確保することができるようになる。その結果、臨床検査データの互換性が空間的にも（何処でも）、時間的にも（いつでも）確保できるようになり、測定される臨床検査データに関して、医療の基礎情報としての信頼性が向上し、同時に個人の健康管理データとしての連続性が確保されるようになる。また、検査機関毎のデータに互換性を確保することができることから、臨床検査結果を意味のあるデータ群として集積し、解析することにより有用な情報を得ることができるようになる。上記のようにトレーサビリティが構築されることにより、以下の効果が期待できる。

①１回の検査結果でも、より適切な医療を実現できる。

②個人の長期間の検査データを健康管理や病気の診断等へ活用することができ、個人差を踏まえた適切な健康管理や保健指導及び医療の実現に大きく寄与することができる。

③現在行われている臨床検査の１割以上が不要な重複検査であるといわれているが、それを無くすことができる。

④日本の多くの企業が供給している医療検査機械システム（検査機器及び検査試薬）について世界で信頼を獲得することができ、国際競争力を強化することができる。

⑤本研究開発は、医療分野の研究開発にとって不可欠な検査データや健康状態等に係る日本全体としてのデータベースを構築するための基盤となる。

１-２　事業概要

本研究開発では国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指す。受託研究期間の３年間で 20 種類程度の実試料系標準物質の開発を行う。これらは、初診時に必須な検査項目と内分泌疾患の病態識別、循環器系疾患や糖尿病患者の治療の判断に必須な項目等重要な項目で、いずれも臨床側から早急な標準物質供給が求められているものであり、また、生活習慣病の予防に必

要な検査項目の多くをカバーするものである。また、純物質系標準物質に関して、現在、世界的にみても認証標準物質が開発されていないために、トレーサビリティ体系が確立されていない純物質系タンパク質を中心に、現在供給されているメーカーレベルの標準物質をトレーサビリティの確保された標準物質へ引き上げることを目的に、３種類程度の純物質系標準物質を開発する。

一方、検査項目の中で量的にそのほとんどを占めるが、現時点ではすぐに高位の標準物質開発に着手することが困難な検査項目については、標準物質の候補となる製造業者の校正物質の調査を行い、それらの中から共同実験により標準物質の候補となる校正物質の選定を行う。

研究開始時点で研究開発等を計画した標準物質の項目を表１にまとめた。本研究開発により、初期診療に必要な項目の大部分および臨床側から早急な標準物質の供給が求められている検査項目について標準物質を整備することが出来る。また、一部の項目については、純物質系標準物質を開発することにより、国際単位系にまで遡及できる理想的な臨床検査のトレーサビリティ体系を社会に示すことができる。

計量標準・標準物質の整備は国等により行われているところであるが、特に安全・安心な国民生活の実現に向けた臨床検査分野の計量標準・標準物質に関しては未整備な部分が多く、速やかな整備が求められている。本事業により、計測のトレーサビリティをほとんど認識していなかった臨床検査分野の関係者にその重要性を認識させることができる。

（注）

①標準物質：下位の標準物質や事業者の校正物質に値付けを行うため、または臨床検査実施機関で測定機器の校正のための基準になる物質であり、事業者や臨床検査機関が共通に使用できるもの。

②実試料系標準物質：実際の試料と類似した組成を持ち、その中の成分濃度が決定された標準物質。臨床検査の分野では、血清、血漿、尿などが分析試料であるため、標準物質もこれらの試料をもとに調製される場合が多い。

③純物質系標準物質：確定した純度を有する物質。それらを単純に溶解した標準液もここに含む。

④校正物質：厳密に計量科学的に定義された用語ではないが、ここでは標準物質と区別するために以下のように定義する。メーカーが独自に設定したもので、主に自社の臨床検査機器・試薬の値付けに用いたり、検査機関等で自社の臨床検査薬を使用する際の校正用として供給したりする物質。

表１　本研究で開発する標準物質一覧

		項目	平成17年度	平成18年度	平成19年度
産総研で研究実施	高純度物質系				
		C反応性蛋白(CRP)	→	→	
		アルブミン(ALB)		→	→
		コルチゾール		→	→
	実試料系Ⅰ				
		血液ガス	→	→	
		グルコース(GLU)	→		
		尿酸(UA)	→		
		クレアチニン(CRE)	→		
		コリンエステラーゼ(CHE)	→	→	
		グリコアルブミン(GA)	→	→	→
		イオン化Ca	→	→	
		ヘモグロビンA1c	→	→	→
		総カルシウム(Ca)		→	
		総マグネシウム(Mg)		→	
		血清鉄		→	
		尿素(UN)		→	
		コルチゾール	→	→	→
		インスリン	→	→	→
		C-ペプチド(CPR)	→	→	→
日本臨床検査標準化協議会に委託	実試料系Ⅱ				
		HDL-コレステロール(HDL-C)	→	→	→
		LDL-コレステロール(LDL-C)	→	→	→
		アルブミン二次標準物質	→	→	→
		アルブミン(ALB):尿	→	→	→
		アルブミン(ALB):血清	→	→	→
		膵型アミラーゼ(P-AMY)	→	→	→
		血清CRP標準物質	→	→	→
		リパーゼ	→	→	→
	実試料系標準物質の調査研究項目				
		尿中ナトリウム(Na)	→		
		尿中 カリウム(K)	→		
		尿クロール(CL)	→		
		尿中マグネシウム(Mg)	→		
		尿中 カルシュウム(Ca)	→		
		尿中尿素窒素(UN)	→		
		尿中尿酸(UA)	→		
		尿中 クレアチニン(Cre)	→		
		尿中アミラーゼ(AMY)	→		
		尿中グルコース(GLU)	→		
		尿中無機リン(IP)	→		
		血清無機リン(IP)	→		
		血清PSA	→		
		血清抗核抗体	→		
		血清Li	→		
		ジゴキシン		→	
		テオフィリン		→	
		β２－マイクログロブリン		→	
		エストラジオール		→	
		プロゲステロン		→	
		テストステロン		→	
		甲状腺刺激ホルモン		→	
		サイロキシン		→	
		βヒト絨毛性ゴナドトロピン		→	
		FDP		→	
		Dダイマー		→	
		CEA		→	
		AFP		→	
		CA125		→	
		フェリチン		→	

1-3　成果の概要

初診時に必須な検査項目のうち標準物質が未整備なものや臨床側より要望の高い項目について、末端ユーザーまでのトレーサビリティ構築を念頭に、それぞれ実試料系標準物質および純物質系標準物質の開発・整備を行った。標準化基本検討委員会において全体の統括を行い、開発の方向性についての合意を得た上で、最終的には、国際的にも認められる臨床検査用標準物質の開発を目指した。

（1）「標準化基本検討委員会」

平成 19 年 4 月 23 日と平成 20 年 1 月 17 日に標準化基本検討委員会を開催し、標準物質開発計画（表２）、進捗状況、今後の方向性についての協議を行った。

（2）「実試料系標準物質の研究開発」

ヘモグロビン A1c 実試料系標準物質については、4%から 12%の範囲で５濃度レベルのプロトタイプを用いて日常検査法での不確かさの評価実験と、国際的な共同実験による認証値の設定を行い、国際的な JCTLM（国際度量衡委員会の下に設置された臨床検査医学におけるトレーサビリティ合同委員会）データベースにノミネーションした。グリコアルブミン、血清鉄、尿素、コルチゾール、インスリン、C-ペプチド、尿中アミラーゼ、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、血清 C 反応性蛋白(CRP)については実試料系標準物質のプロトタイプを作製し、反応特性と日常検査法との互換性試験を実施し、標準物質に必要な性状を明らかにした。尿中ナトリウム・カリウム・塩素・マグネシウム・カルシウム・尿酸・尿素窒素・クレアチニン・グルコース・無機リン、血清無機リン・リチウムについては、実試料系標準物質候補について標準物質として必要な安定性の評価を行い、尿用標準物質については、標準物質の開発が可能となった。アルブミン、膵型アミラーゼについては実試料系標準物質の値付けを実施した。リパーゼについては、各社試薬での共同実験をもとに、標準物質に必要な特性や調製方法を決定した。

（3）「純物質系標準物質の研究開発」

C 反応性蛋白の純物質系標準物質(標準液)については、値付けを実施し、標準物質供給が可能となった。アルブミンの純物質系標準物質については値付けのための基準測定法を確立した。コルチゾールの純物質系標準物質に関しては、値付けの基準とする高純度標準物質および供給用の候補品の調製方法を決定するとともに、値付けのための測定方法を確立し、目標の不確かさ 1%以内での値付けの見通しを得た。

1-4　目的に照らした達成状況

本年度において実試料系標準物質の開発を予定している血清関連 16 項目の標準物質および尿関連 11 項目の標準物質に関しては、ほぼ予定通り進捗した。ヘモグロビン A1c 実試料系標準物質については、2008 年 4 月に JCTLM（検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会）データベースへ登録申請をおこなった。さらに、次年度には HDL-および LDL コレステロールおよびグルコアルブミンを JCTLM にノミネーションする予定である。また、当該年度調査研究を行った 27 項目のうち、尿中電解質及び尿中生化学物質標準物質および血清無機リン、リチウムの項目については、平成 17 年度の調査研究の結果から標準物質開発への見通しが得られ、尿用の実試料系

標準物質の開発研究を行ったものである。

純物質系標準物質に関しては、当初開発を計画した 3 項目（C 反応性蛋白、アルブミン、コルチゾール）の標準物質の作製技術を開発した。特に、C 反応性蛋白は認証標準物質の開発を終了し、認証標準物質としての供給を開始した。本標準物質に関しては次年度の JCTLM にノミネーションする予定である。また、アルブミンとコルチゾールに関しては純物質系標準物質の作製方法および値付け方法を開発、純物質系標準物質の製造を可能にした。

なお、実試料系標準物質の調査研究に関しては、平成 17 年度および 18 年度で標準物質が作製可能と判断した項目について、実験計画書および標準物質候補品を作製し、検証実験を行った。このうち E2、LH、FSH、FT4、β 2-マイクログロブリンについては、プール血清（抗原未添加）が有効という結果を得た。

２．成果の詳細

２-１　標準化基本検討委員会

２-１-１　目　的

標準化基本検討委員会では、本委託事業において研究開発するメーカー標準品、実試料系標準物質あるいは純物質系標準物質を現場レベルの臨床検査室から国家計量標準までのトレーサビリティ連鎖の各段階で活用できるようにするため、実試料系および純物質系標準物質の各開発および調査研究の方向性を検討し、進捗状況を報告・審議し、最終的に開発したものの妥当性を審議することを責務としている。

本委託事業で研究する純物質系標準物質開発と実試料系標準物質開発を統括するとともに、それらを結びつけるための活動、また、実際にユーザーに供給される試薬メーカーレベルの標準物質までのトレーサビリティの構築を行うとともに、専門家や標準物質のユーザーなどの意見をとりまとめ、よりよい標準物質開発に反映させる。また、開発した標準物質について、国際的な認知を受けるため、「検査医学におけるトレーサビリティに関する合同委員会 (Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine: JCTLM)」の標準物質データベースへのノミネーション作業を行う。

２-１-２　委員会構成

＜委員長＞

濱﨑　直孝　　長崎国際大学　薬学部　教授

＜委員＞

今井　秀孝　　日本臨床検査標準協議会　会長

渡邊　清明　　日本臨床検査医学会　（国際医療福祉大学　教授）

矢辺　良平　　（社）日本分析機器工業会　医療機器委員長

千葉　光一　　独立行政法人　産業技術総合研究所　計測標準研究部門　副部門長

中山　隆志　　経済産業省　産業技術環境局知的基盤課　課長

高木　康　　日本臨床検査医学会　（昭和大学医学部　教授）

桑　克彦　　日本臨床検査標準協議会　認証委員会委員長　（筑波大学大学院　准教授）

中原　一彦　　日本医科器械学会　（独立行政法人　大学評価・学位授与機構　教授）

登　　勉　　日本臨床化学会　会長　（三重大学　医学部　教授）

細萱　茂実　　日本臨床衛生検査技師会　（山梨大学医学部附属病院　検査部）

大和　隆　　日本臨床検査薬協会　技術委員会　副委員長

佐守　友博　　日本衛生検査所協会　理事

＜オブザーバー＞

高橋　昌行　　経済産業省　産業技術環境局　知的基盤課

山本　健一　　NEDO　研究開発推進部　主幹

黒川　俊秀　　NEDO　研究開発推進部　主査

＜事務局＞

藤橋　和夫　　日本臨床検査標準協議会　事務局長

2-1-3　活動総括

平成 19 年 4 月 23 日に第 1 回委員会を開催し、各研究実行グループからの昨年度までの研究報告および研究計画の提案を受けて、今年度も引き続きこれまでの体制で研究を実施することを決定した。また、平成 20 年 1 月 17 日に第 2 回委員会を開催し、標準物質開の進捗状況の報告を行うとともに、研究のまとめおよび今後の方針についての議論を行った。本事業が、実際の標準物質開発のみならず、トレーサビリティ概念の普及という面からも大きな役割を果たしたとの指摘があり、今後も何らかの形で是非継続をしていただきたいとの委員長のコメントで締めくくられた。

表 2　研究実施体制

		臨床検査実用標準物質開発研究推進体制（案）　2005年8月9日現在				
		リーダ（併任研究者）	対象（H17年度開始）	標準化検討機関	対象（H18年度開始）	標準化検討機関
産総研で研究実施	純物質系	高津　章子　（産総研）	CRP	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		加藤　尚志　（産総研）	アルブミン	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		加藤　愛　（産総研）	コルチゾール			
	実試料系Ⅰ	桑　克彦　（筑波大）	血液ガス	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）		
		≪代謝成分系標準物質≫	グルコース	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		福永　壽晴　（金沢医大）	クレアチニン	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		星野　忠夫　（病態解析研究所）	尿酸	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		武井　泉　（慶応大）				
			コリンエステラーゼ	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
			イオン化Ca	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）		
			ヘモグロビンA1c	JSCC（糖尿病関連指標専門員会）		
			グリコアルブミン	JSCC（糖尿病関連指標専門員会）		
		藤橋　和夫　（JCCLS）			総Ca	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）
		≪電解質系標準物質≫			総Mg	JSCC（血液ガス・電解質専門員会）
					尿素	JSCC（酵素・試薬専門員会）
		千葉　光一　（産総研）	コルチゾール			
		≪ホルモン系標準物質≫	インスリン	JDS（糖尿病関連検査委員会）		
		竹越　博一　（筑波大）	CPR	JDS（糖尿病関連検査委員会）		
		桑　克彦　（筑波大）				
日本臨床検査標準協議会へ委託	実試料系Ⅱ	濱崎　直孝　（九大）	HDL-コレステロール	臨床検査医学会JSLM（標準委員会）		
		≪脂質系標準物質≫	LDL-コレステロール	JSCC		
		櫻林　郁之介　（自治医大）				
		桑　克彦　（筑波大）				
		美崎　英生　（カイノス）	アルブミン二次標準物質	JSCC（酵素・試薬専門員会）	リパーゼ	JSCC（酵素・試薬専門員会）
		≪タンパク・酵素系標準物質	アルブミン（血清）	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		伊藤　喜久　（旭川医大）	アルブミン（尿）	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
		藤田　孝　（藤田保健衛生大学）	膵型アミラーゼ	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
			血清CRP標準物質	JSCC（酵素・試薬専門員会）		
	調査研究	登　始　（三重大学）	≪調査研究項目≫	JCCLS	≪調査研究項目≫	JCCLS
		藤橋　和夫　（JCCLS）	尿中ナトリウム（Na）	臨床検査薬協会	ジゴキシン	臨床検査薬協会
		大和　隆（臨薬協）	尿中 カリウム（K）		テオフィリン	
			尿クロール（CL）		β2－マイクログロブリン（free　β）	
		桑　克彦　（筑波大）	尿中マグネシウム（Mg）		エストラジオール	
		森下　芳孝　（三重大）	尿中 カルシュウム（Ca）		プロゲステロン	
		竹越　博一　（筑波大）	尿中尿素窒素（UN）		テストステロン	
		小田桐　恵美　（東京女子医大）	尿中尿酸（UA）		甲状腺刺激ホルモン	
		家入　蒼生夫　（独協医大）	尿中 クレアチニン（Cre）		サイロキシン	
		加野　象次郎　（東京逓信病院）	尿中アミラーゼ（AMY）		βヒト毬毛性ゴナドトロピン	
		福武　勝幸　（東京医大）	尿中グルコース（GLU）		FDP	
		熊谷　俊一　（神戸大）	尿中無機リン（IP）		Dダイマー	
		小柴　賢洋　（神戸大学）	血清無機リン（IP）		CEA	
		富永　真琴　（山形大）	血清PSA（前立腺性特異抗原）		AFP	
			血清抗核抗体		CA125	
			血清Li		フェリチン	

表 3　平成 19 年度開発研究計画

	項目	平成17年度	平成18年度	平成19年度	
産総研で研究実施	**高純度物質系**				
	C反応性蛋白 (CRP)	→	→	→	
	アルブミン (ALB)	→	→	→	
	コルチゾール	→	→	→	
	実試料系 I				
	血液ガス	→	→		
	グルコース(GLU)	→	→		JCTLM へ登録済み
	尿酸(UA)	→	→		
	クレアチニン(CRE)	→	→		
	コリンエステラーゼ(CHE)	→	→		
	グリコアルブミン (GA)	→	→	→	
	イオン化Ca	→	→		
	ヘモグロビンA1c	→	→	→	
	総カルシウム (Ca)		→		
	総マグネシウム (Mg)		→		
	血清鉄		→	→	
	尿素(UN)		→	→	
	コルチゾール	→	→	→	
	インスリン	→	→	→	
	C-ペプチド(CPR)	→	→	→	
	尿中ナトリウム (Na)		→	→	
	尿中 カリウム (K)		→	→	
	尿クロール (CL)		→	→	
	尿中マグネシウム (Mg)		→	→	
	尿中 カルシウム (Ca)		→	→	
	尿中尿素窒素 (UN)		→	→	
	尿中尿酸 (UA)		→	→	
	尿中 クレアチニン (Cre)		→	→	
	尿中アミラーゼ (AMY)		→	→	
	尿中グルコース (GLU)		→	→	
	尿中無機リン (IP)		→	→	
	血清無機リン (IP)		→	→	
	血清ビリルビン (BIL)		→		
	血清リチウム (Li)		→	→	
日本臨床検査標準化協議会に委託	**実試料系 II**				
	HDL-コレステロール (HDL-C)	→	→	→	
	LDL-コレステロール (LDL-C)	→	→	→	
	アルブミン標準物質 (実用)	→	→	→	
	アルブミン(ALB):尿標準物質 (常用)	→	→	→	
	アルブミン(ALB):血清標準物質 (常用)	→	→	→	
	膵型アミラーゼ (P-AMY)	→	→	→	
	血清C反応性蛋白 (CRP) 標準物質	→	→	→	
	リパーゼ	→	→	→	
	実試料系標準物質の調査研究項目				
	尿中ナトリウム (Na)	→	→		実試料系標準物質の開発へ展開
	尿中 カリウム (K)	→	→		
	尿クロール (CL)	→	→		
	尿中マグネシウム (Mg)	→	→		
	尿中 カルシウム (Ca)	→	→		
	尿中尿素窒素 (UN)	→	→		
	尿中尿酸 (UA)	→	→		
	尿中 クレアチニン (Cre)	→	→		
	尿中アミラーゼ (AMY)	→	→		
	尿中グルコース (GLU)	→	→		
	尿中無機リン (IP)	→	→		
	血清無機リン (IP)	→	→		
	血清ビリルビン (BIL)	→	→		
	血清前立腺特異抗原 (PSA)	→	→		
	血清抗核抗体	→	→		
	血清リチウム (Li)	→	→		
	リウマチ因子 (RF)		→		
	ジゴキシン		→		
	テオフィリン		→		
	プロラクチン		→		
	黄体形成ホルモン		→		
	卵胞刺激ホルモン		→		
	エストラジオール		→		
	甲状腺刺激ホルモン		→		
	サイロキシン		→		
	サイログロブリン		→		
	β２－マイクログロブリン		→		
	ヒト絨毛性ゴナドトロピン		→		
	癌胎児性抗原 (CEA)		→		
	α－フェトプロテイン (AFP)		→		
	フェリチン		→		
	フローサイトメトリー(FCM)		→		

2-2　実試料系標準物質の研究開発

2-2-1　総括

1．研究の進め方

実試料系標準物質の研究開発は、学協会の専門委員会での作業との連携による方法ならびに標準化基本検討委員会の中に設置ワーキンググループ(WG)による方法で行った

なお、本実施の詳細については2-2-3項に記載した。

このうち日本臨床化学会（JSCC）の専門員会と連携した測定項目は、グリコアルブミン、ヘモグロビン A1c (HbA1c)、アルブミン、膵型アミラーゼ、血清C反応性蛋白(CRP)、リパーゼおよび血清リチウム(Li)である。また、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）の標準物質小委員会との連携した測定項目は、ヘモグロビン A1c(HbA1c)である。

標準化基本検討委員会を設置し、検討のための WG を関連の学協会との協力で組織した測定項目は、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール、HDL コレステロール、LDL コレステロールおよびアルブミンである。

また、本研究で得たプロトタイプから設定したヘモグロビン A1c (HbA1c)、HDL コレステロールおよび LDL コレステロール測定用の実試料標準物質については、（財）機械システム振興協会による平成 19 年度受託事業「臨床検査用自動分析装置における自動校正システムの開発に関するフィージビリティスタディ」において、自動分析装置の校正試料として用いた。さらに、平成 19 年度の本研究において、ヘモグロビン A1c (HbA1c)、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールについての試薬キットを用いた自動分析装置による互換性評価試験については、（財）機械システム振興協会による平成 19 年度受託事業「臨床検査用自動分析装置における自動校正システムの開発に関するフィージビリティスタディ」の成果を参考にした。

なお、実試料標準物質のプロトタイプの調整あるいは作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター（現有限責任中間法人検査医学標準物質機構、ReCCS）、旭化成ファーマ㈱、シスメックス㈱およびオリエンタル酵母工業㈱の協力を得た。

2．結果のまとめ

実試料系標準物質の研究開発の結果は以下のごとくである。

（1）グリコアルブミン

1）設定したグリコアルブミン測定の JSCC 基準測定法により、血清標準物質の認証値とその不確かさを求めた。その結果、本血清標準物質の認証値は、レベル1および2についてそれぞれ 258 ± 8 mmol/mol、471 ± 13　mmol/mol となった。

2）本血清標準物質のコミュータビリティについて検討した。その結果、コミュータビリティの評価には NCCLS のガイドラインを参考にし、Passing–Bablok の直線回帰式を適用したところ、グリコアルブミンの日常検査法（単位は%であるが、図2では比較のためそれを 10 倍して mmol/mol として示す）との関係において、標準物質と実試料の回帰式は同じであり、

かつ標準物質のばらつきは、実試料のばらつきの 95%信頼区間にはいっており、本標準物質にはコミュータビリティがあることが確認できた。

（2）ヘモグロビン A1c（HbA1c）

1）標準物質に必須のコミュータビリティの評価を行った。

2）ADA、EASD、IDF および IFCC の国際学術 4 団体による HbA1c のトレーサビティ体系と HbA1c の単位に関するコンセンサス・ステートメントが出されたことから、それに合致した標準物質の設定を行った。

3）上記ステートメントに合致した標準物質の開発において、IFCC レファレンス法による測定値と、JDS 校正 KO500 法による JDS 値との関係式を設定した。

4）上記ステートメントでは、米国の HbA1c に関する標準化機構である NGSP にトレーサブルな値と、IFCC 値との関係式を設定しており、IFCC 値を求めればその関係式（IFCC-NGSP 換算式）によって NGSP 値が得られる。それを換算 NGSP 値として、IFCC 値とともに報告するように求めている（IFCC 値の単位は mmol/mol であり換算 NGSP 値の単位は%である）。すなわち、IFCC 値、換算 NGSP 値、および、JDS 値の 3 つが存在することになる。この 3 つが問題なく整合するか否かについて、作製した標準物質を用いて検証した。

（3）血清鉄

1）国際的に評価の得られた認証標準物質がないため、ICSH 国際標準法の妥当性を評価する実験を行った。その結果、国際標準法での除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差は、いずれも約 5 %であった。しかし、測定する血清中のタンパク濃度によってはこの値は変化する。また、除タンパク処理での血清の希釈倍数を 8 倍以上に高めれば、血清鉄濃度が 100 μg/dL 以下の検体では測定する吸光度が 0.01 以下に低下して、十分な測定精度が得られないことから、国際標準法の除タンパク処理での容積置換による濃縮誤差を回避する方法としては、標準添加法で測定する方法が最も妥当であるとした。

2）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティ評価を行った。その結果、レベル 1 およびレベル 2 について、それぞれ 8.87 ± 0.32 μmol/L 、21.50 ± 0.48 μmol/L となった。また、保存安定性試は- 70 ℃、- 20 ℃保存条件で行った結果、対照として- 120 ℃保存品を同時に血清鉄の日常検査法で測定したところ、- 70 ℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また、- 20℃保管品は 3 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、4 ヶ月間で対照品よりも 2%ほど高値となった。

（4）尿素窒素

1）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティの評価を行った。

2）本標準物質を解凍し、室温（25±2 ℃）での安定性試験を行った。その結果、室温で 1、3、6 時間放置したものと- 70 ℃保存品との測定値の差はみられなかった。従って、解凍した本

標準物質は室温で 6 時間安定であった。

3）保存安定性試験は- 70℃、- 20℃保存条件で行った。その結果、- 70℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また- 20℃保管品も 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、血清の濁りが増加しており日常検査法の種類によっては測定値に影響が出る恐れがある。これらの結果より、本標準物質の保存期限は- 70℃保存で 9 ヶ月間、- 20℃保存で 6 ヶ月間とした。

（5）インスリン

1）血清中のインスリン測定について、平成 18 年度の共同実験にて、実試料系標準物質がデータの収束性に有効性であることが示唆された。

2）実試料標準物質候補品での収束性を再確認する目的で、標準物質候補品として試料を作製し、あわせて健常人血清を測定した。

3）現在の市販試薬では１キットを除くと血清値は収束していることが再確認された。

4）血清測定値と実試料標準測定値と挙動が異なる試薬が確認されている為、実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる２試薬を用い、各試薬の校正を実施した結果、その優位性はなく、各試薬共に収束性が確認された。

5）試作した実試料標準物質が常用標準物質としてその有用性が実証できた。

（6）C-ペプチド

1）血清中の C-ペプチド測定について、平成 18 年度の共同実験にて、実試料系標準物質がデータの収束性に有効性であることが示唆された。

2）実試料標準物質候補品での収束性を再確認する目的で、標準物質候補品として患者プール血清試料を作製し、あわせて健常人血清を測定した。

3）現在の市販試薬では血清値は収束していることが再確認された。

4）実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる５試薬を用い、各試薬の校正を実施した結果、前回同様の収束性が確認された。

5）試作した実試料標準物質が常用標準物質としてその有用性が実証できた。

（7）コルチゾール

1）共同実験により値付けしたプール血清を用いることで、実試料標準物質候補品としてデータ収束の有効な手段となりうるか検証した。

2）コルチゾールパネル血清表示値と各社の実測値で相関（傾きおよび相関係数）がもっとも良好の試薬を用いプール血清の値付けを行う。

3）値付けされたプール血清と各社キットの実測値を用い、各社キットの換算係数を求める。

4）求められた換算係数を用い、パネル血清実測値を換算することでデータ収束の可能性を検討した。

（8）HDL コレステロール、血清 LDL コレステロール

1）血清 HDL コレステロール（HDL-C)、血清 LDL コレステロール（LDL-C）の測定において、市販試薬のデータの収束性を可能にするため平成 17 年度、18 年度の検討結果に基づいて、新鮮ヒトプール血清による効果の確認および作製方法について検討した。

2)直接法試薬を製造している 6 社を中心に新鮮ヒトプール血清 10 種類を作製し､収束性の検討、使用した各血清の性状、安定性についても併せて調査し実試料標準物質候補品の性状規格（案)、試料調製方法（案）を設定した。作製した試料の電気泳動パターンを確認して用いることで、収束性が向上する試料の作製の可能性が示唆された。

3）実試料標準物質の候補品の性状規格（案）の中で最も重要なのは電気泳動パターンが正常であるということであり、絶対条件である。HDL-C、LDL-C はともにリポ蛋白中に存在するコレステロールであり、そのリポ蛋白の状態等により測定試薬の反応性が大きく変わる場合があるので、試料作製の際の選別およびその後の保管には細心の注意が必要である。

4）上記の検討結果より、目的の候補品の作製方法、性状規格（案）についてのガイドラインを提示することができたが、新鮮なヒト血清の入手にはボランティアの協力が必要であるために現実的には小グループでの使用に限定される。

今後、これら実試料タイプの標準物質の作製に際しての大きな課題として、新鮮なヒト血清の入手ルートの確立、が先ず必要である。

（9）測定用常用参照および実用血清標準物質（アルブミン）

1）ヒト血清アルブミンから高純度に分離精製した単量体アルブミンを原料にして試作された 2 種類の臨床検査用アルブミン標準物質（常用参照標準物質、血清用実用用標準物質）を用いて、市販測定キットの測定特性を検討した。

2）常用参照標準物質については、その下位に位置する血清用実用標準物質から試薬校正物質（市販キット添付校正物質）への値のトランスファーラビリティを確認することができた。

3）今回作製した常用参照標準物質および血清実用標準物質を用いたトレーサビリティ連鎖が成立しない原因が日常検査法のアルブミンに対する反応特異性に起因することが確認できた。

4）改良 BCP 法はアルブミン特異性の高く、本法を採用すればトレーサビリティ連鎖確保の可能性が示唆された。

5）一次基準測定法にはアルブミン水解アミノ酸の同位体希釈質量分析法、常用基準測定法には HPLC-BCG 法によるトレーサビリティ連鎖を構築する可能性を確認した。

（10）アルブミン常用基準測定法

1）血清アルブミン測定の常用基準法設定は HPLC 法を基本とし、分離後のアルブミン検出法について主に検討を行った。紫外部吸収法（280 ㎚)、蛍光法（励起波長 285㎚、蛍光波長 340 ㎚)、ポストカラム発色法（BCG 発色）の 3 法について行ったが、ネフェロメトリー法との予備相関から BCG 発色法を常用基準法試案（HPLC-BCG 法）として選定した。

2）HPLC-BCG 発色法とネフェロメトリー法との予備相関において、正の切片が認められたが、使

用した BCG 試薬に起因した切片であることが明らかとなった。移動相と BCG 試薬を等量混合し発色液とした際に、血清の希釈試験が原点を通る直線となるように界面活性剤を増量した処方とした。また、アルブミンとグロブリンの分離能を向上させるためにカラム長を 20 ㎝（10 ㎝×２本）とした。

3）最終的にネフェロメトリー法との相関性を調べたところ、極めて良好な相関関係が得られ、透析患者や高ビリルビン血清における乖離例も認められなかった。しかし、普遍性の検討では施設差が比較的大きく、さらに測定プロトコルを見なおす必要があった。

4）HPLC-BCG 法を対照に日常検査法の評価を行ったところ、BCG 法および BCP 法は測定法の問題点からトレーサブル連鎖が成立しなかった。連鎖が確保できる可能性があった測定法は改良 BCP 法であった。

5）JCCLS 試作の実用標準物質との反応性は、日常検査法では改良 BCP 法においても患者血清とは若干異なった。また、メーカー差も認められた。

（11）尿アルブミン

1）尿アルブミン常用標準物質の品質規格を策定した。

2）策定した品質規格に適合した尿アルブミン常用標準物質を作製した。

3）本常用標準物質の値付けは、CRM470 を上位標準物質として実施する。

（12）膵型アミラーゼ

1）膵型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の基本方針は、抗ヒト S-AMY 抗体を用いて S 型アミラーゼ活性を阻害した後、残存した膵アミラーゼの活性を総アミラーゼ活性測定 JSCC 勧告法で行うことを基本とした。

2）２社、4 種類の抗ヒト S-AMY 抗体による S-AMY 活性阻害条件の検討を実施し、P-AMY 活性に全く影響なく、S-AMY 活性を 95%以上阻害する条件を確立した。

3）抗ヒト S-AMY 抗体は被検体に予め添加処理するのではなく、アミラーゼ活性測定試薬を添加する方法とした。

4）JC・ERM（Lot 005）は、膵型 AMY 活性測定の常用標準物質として使用できることが確認できた。

5）膵型アミラーゼの基準範囲が設定できた。

（13）血清 C-反応性蛋白(CRP)

1）ヒト CRP 遺伝子を大腸菌に組み込み、リコンビナントヒト CRP（ｒCRP）を作製し、高品質の CRP 供給体制を確立した。

2）ｒCRP の物理化学的性質は天然の血清ヒト CRP と同等であった。

3）ｒCRP を用いてヒト CRP の常用参照標準物質および実用標準物質を作製した。

4）常用参照標準物質および実用標準物質の候補品の標準物質としての性能を評価した結果、両候補品とも十分な性能を有していることが確認された。

5）常用参照標準物質および実用標準物質の規格を作成し、候補品を評価の結果、両者とも規格を満たしていた。
6）CRM470 を基準に作成されている各社標準物質によりキャリブレーションを行い患者血清を測定した場合の相関係数は r=0.998～1.000、CRP 標準物質候補品を用いてによりキャリブレーションを行って患者血清を測定した場合の相関係数は r=0.998～1.000 と、CRM470 の結果を得られることが確認できた。

（14）リパーゼ
1）日本臨床化学会リパーゼプロジェクト委員会では、血清リパーゼ活性測定の標準化を目的として、JSCC 常用基準法を設定するための作業を行い、JSCC 常用基準法（案）を準備することができた。そこで、本常用基準法（案）を用いて、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）とヒト血清との反応性試験を行った結果、JC-ERM はヒト血清との反応性が異なった。
2）この原因を究明するため、ヒト血清の反応タイムコースを調べた結果、検体と試薬の反応過程において、白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がることが確認された。そこで、この現象を回避するために、第一試薬にも硫酸マグネシウムを添加し、第一反応でグリセロールを消去する方法に、JSCC 常用基準法（案）を改良した。
3）そこで、今回、この改良 JSCC 常用基準法（案）を用いて、再度、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）とヒト血清との反応性試験および酵素標準物質の標準値の値付けを行うための普遍性試験を行った。
4）その結果、JC-ERM とヒト血清の反応性は、相対残差で最大 13 %以内で一致することが確認できた。しかし、普遍性試験では、この改良 JSCC 常用基準法（案）においても、ヒトプール検体で白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がる検体が認められた。そこで、この原因を究明することが、今後の課題となった。

（15）尿中電解質成分
1）平成 18 年度の活動において作成した尿電解質成分の常用参照標準物質候補品の安定性試験を実施した。
2）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。
3）本研究により尿電解質成分（Na、K、Cl）の常用参照標準物質としての有用性が確認された。

（16）尿中生化学成分
4）平成 18 年度の活動において作成した尿中生化学成分の常用参照標準物質候補品（アミラーゼを除く）の安定性試験を実施した。
5）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

6）本研究により尿用のカルシウム・マグネシウム・尿酸・尿素窒素・グルコース・クレアチニン、無機リンの常用参照標準物質としての有用性が確認された。

（17）尿中アミラーゼ

1）平成 18 年度の活動において、P 型アイソザイムをヒト天然型に変更した処方にてプレ試験を実施し、収束性が見られたので、各メーカー使用のキャリブレータ、コントロールおよび検体も含めて各メーカー試薬と組み合わせた場合の測定値収束性の効果を調査した。測定値収束性の効果判定方法は各社の測定プロトコルに従い患者尿 25 例を測定した。その際、血清用常用参照物質（JCCLS CRM-001a）も検体として測定した。

2）その結果、プレ試験の結果が再現されず再検討が必要と考えられた。ただし、同一処方の試薬間、同一基質の試薬間においてかなりの乖離が見られたこと、プレ試験の検討において乖離が見られない試薬間においても問題があることから、検体の安定性、遠心分離を含む前処理も問題等標準物質では説明出来ない問題もあることが判明し今後の課題となった。

（18）血清無機リン

1）平成 18 年度の活動において作成した血清無機リンの常用参照標準物質候補品の安定性試験を実施した。

2）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

3）本研究により血清無機リンの常用参照標準物質としての有用性が確認された。

（19）血清リチウム(Li)

1）実試料標準物質候補品のプロトコルの作成を目的とする研究を実施した。

2）平成 18 年度までのまとめ：血清リチウムについては、国内各種サーベイランスの対象になっていないことから、具体的な互換性について認識がない。実試料標準物質候補品(3 水準)を用いて検証実験を行い、有用性を再確認した。

3）今年度は実試料標準物質候補品の安定性を確認した。

4）昨年度作成した実試料標準物質候補品を冷凍保存し、ＷＧ参加メーカーで測定した。測定方法は、電極法、色素法である。

5）冷凍保存で、１年間の安定性が確認できた。

6）実試料標準物質候補品の確立ができたと考えられた。

（20）HDL コレステロール、血清 LDL コレステロール測定用血清標準物質

1）HDL コレステロールおよび LDL コレステロール測定用血清標準物質を作製した。

2）本血清標準物質のベース血清は、NCCLS（現 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute）のドキュメント（CA37-A）による調製ならびにバリデーション(validation：妥当性確認)の方法にしたがってヒト新鮮血清を用いて調製し、さらに日常検査法でコミュータ

ビリティ(commutability：互換性)のあることを確認した。

3）HDL-C および LDL-C の値付けは、CDC（Center for Disease Control and Prevention:アメリカ疾病予防センター）のレファレンス法によった。

4）値付けの作業は、国際 3 機関（アメリカのワシントン大学ノースウエスト脂質代謝・糖尿病研究所、カナダのカナダ外部精度評価研究所、日本の（有限責任中間法人）検査医学標準物質機構（ReCCS)による共同実験によった。

5）本血清標準物質を、現状の LDL-C 測定の直接法である日常検査法に適用した場合の予備的な結果は、直接法 11 キットについて、本血清標準物質を測定試料として直接測定したところ、測定値の相対バイアスの大きさは順に-7.2%、-5.7%、-4.1%,-2.6%、-2.3%、-1.8%（3 キット)、-1.1%、0.5%、2.0%であった。±5%以内がキットの許容限界とすると、9 キットはメーカーでの標準測定操作法を介さなくても精確さが維持されていた。

6）本血清標準物質は、メーカーの基準とする測定操作法の親として用いるが、最終的な精確さの伝達は、メーカーのキットの添付文書に従う。

3．今後の課題

実試料標準物質の研究開発についての今後の課題は以下のごとくである。

（1）国際標準化への対応

1）実試料標準物質について、値付けの方法、認証書および取扱説明書が作成し、かつこれらの文書の英文化を行い､国際標準化のために JCTLM ノミネーションの準備ができる測定項目はＨＤＬコレステロールおよび LDL コレステロールであり、次回の Cycle の JCTLM ノミネーションを準備する。

2）本研究開発で実試料標準物質の設定が今後可能な測定項目は、グリコアルブミン、インスリン、C-ペプチド、コルチゾールである。このうちグリコアルブミンについては、JCTLM へのノミネーションを予定する。

2-2-2　実施態勢

１．はじめに

臨床化学分析を主とする臨床検査の標準化作業のポイントは、基準の測定方法の設定、標準物質の設定および許容限界の設定である。このうち検査データの互換性の確保は、標準物質を用いてトレーサビリティをとることで得られる。この考え方は今では国際的なコンセンサスが得られている。近年、このような標準化の作業が国際的に進み、ISO/TC212 における作業から、標準物質やキャリブレータおよび管理物質などについての国際規格が発効された。これにより体外診断用医薬品・医療機器として用いる測定試薬の測定値は、トレーサビリティを取り、結果として互換性も得られることが保証される。そのための日常検査で用いる常用の標準物質の設定が最重要となる。

臨床検査におけるトレーサビリティ連鎖(traceability chain)は、計量学的な考え方を参考にしてISO 17511（体外診断用医薬品―生物試料の定量測定―校正物質と管理物質の表示値の計量学的トレーサビリティ）および ISO 18153（体外診断用医薬品―生物試料の定量測定―校正物質と管理物質の酵素活性表示値の計量学的トレーサビリティ）で、明らかにされている。

ISO 17511 のおけるトレーサビリティ連鎖の基本は、専門家の組織が作製した一次基準測定操作法(primary reference measurement procedure)やそれによって値付けられた一次校正物質(primary calibrator)は、その表示値を製造業者の校正物質に伝達し、最終的には臨床検査室の日常測定操作法に伝達される。この場合、最終使用者による測定値は、製造業者の測定操作法とは逆な方向を経て、標準物質が本来定めた表示値に戻ることが可能となる。これにより日本はおろか国際的にも測定値の整合性が確保できるわけである。

膨大な項目に及ぶ生体試料を取り扱う臨床検査医学の領域では、対象項目の性質が十分に解明され、SI 単位として表示できるものから、測定項目自体の性質が解明されず、定量的な測定が極めて困難な項目と多岐にわたって存在している。そのためトレーサビリティの確立には上位の基準測定操作法と、それによって値付けられた校正物質の存在が不可欠であり、それらの種類によって代表的な階層段階が提示されている。

なかでも生物活性を測定する系では、基準測定操作法の設定は困難であることから SI 単位に直結しない。しかし、医療としては必須であることから、このような測定系については、非 SI 単位系として組み立てることで、最上位の多くは WHO 標準品などにトレーサブルとすることで合意されている。

さらに基準測定法および一次校正物質も存在しない場合の測定系は、企業が独自の判断で測定操作法を確立し、それによって最終的には製品校正物質に値付けをする。腫瘍マーカーや抗体測定など多くの項目(約 300 種類)がこの段階に属している。

そこで基準測定操作法や一次校正物質などを順次決めていくやり方は困難かあるいはそれには膨大な時間がかかるので、下からの標準化すなわちメーカーの日常測定操作法のキャリブレータの値付けに使われているメーカーの基準（製造業者社内標準測定操作法や製造業者実用校正物質：manufacturer’s working calibrator）から、共通に使うことができるものを選択する方法も検討

対象にすることが必要となる。

近年、ライフサイエンス分野における研究の進展等を背景として、遺伝子操作やタンパク質の分析等、バイオテクノロジー技術の具体的利用に当たって、医療や食料といった分野を中心に、計量標準（標準物質）の整備の必要性が国際的に注目されているCIPM（国際度量衡委員会）においても、2001 年にCCQM（物質量諮問委員会）にバイオアナリシスWG が設置されてDNAの定量のパイロットスタディが開始され、順次、他の項目についてもパイロットスタディの拡張が予定されており、また実行されている。

2002 年6 月にCIPM（ International-Committee of Weights and Measures：国際度量衡委員会物質量諮問委員会）とIFCC、ILAC及びWHOが共同でJCTLM（Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine）を発足させ、臨床検査薬（体外診断薬）・検査機器のためのトレーサビリティの確立に向けた高純度標準物質と実用標準物質に値付けを行う機関のデータベース化を進めている。JCTLM は、①医療計量トレーサビリティの確立、②国立標準研究所と臨床医療研究所との連携強化、③医療計量トレーサビリティ概念の啓発、④認証標準物質・計測方法などの開発、⑤標準測定システムを開発するIVD（体外診断検査）企業の育成、を目的としている。臨床検査の分野において、これは、①国際的な「トレーサビリティを確立」し、②臨床検査結果の「信頼性と互換性を確保」する、という２大目的にまとめられることから、実際上、２つのWG（ワーキング・グループ）によって組織が構成されることとなった。そのうちのWG１（Quality management in the Clinical laboratory）では標準物質と基準測定操作法の検討を、WG２（Reference system）では実用標準物質に値付けを行う機関の認定についての検討と、そのネットワーク化についての検討を行っており、ライフサイエンス分野全般における計量標準の開発・整備に向けた国際的な動きが活性化しはじめている。よって、我が国の企業が供給している臨床検査薬・検査機器の信頼性の保証、人の健康管理や病気の診断にとって重要な検査項目に必要となる計量標準についても、開発・整備することが急がれている。

特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会（Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards：JCCLS）における標準化活動に対する基本的な理念と方針は、①臨床検査データの各施設間での互換性を確保し、②共通の臨床判断ができるような標準化作業を推進し、かつ③関連学協会からの標準化に関する情報を集約し、④早急に必要な標準物質の設定作業を行うこと、とされており、また、中・長期的な将来戦略としては、①標準化基本検討委員会を設け、②臨床に必須な測定項目を選択し、③標準物質の設定作業を加速させ、④臨床検査データベース化の布石とする、という内容を掲げている。そのため、上記計量標準についても 2005 年 11 月より WG を発足させ、その活動を開始し、平成 20 年３月で終了した。

２．実施態勢

実試料系標準物質の研究開発にあたっては、表１のごとくの実施態勢をとった。すなわち学協会の専門委員会での作業と連携して行う方法と、標準化基本検討委員会の中に検討のためのワーキンググループ(WG)によった。このうちグリコアルブミン（GA）およびヘモグロビン A1c(HbA1c)は、日本臨床化学会（JSCC）の糖尿病関連指標専門委員会のプロジェクト、実用および血清アル

ブミン、尿アルブミン、膵型アミラーゼ(PAMY)、血清 C-反応性蛋白(CRP)およびリパーゼは、同会の酵素・試薬専門委員会プロジェクト、血清鉄および尿素窒素は、日本臨床検査協議会標準物質小委員会との連携によった。

標準化基本検討委員会内に WG を設置した測定項目は、インスリン、C-ペプチド、コルチゾール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、実用および血清アルブミン、尿アルブミン、尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リンおよび血清リチウム(Li)である。

実試料標準物質のプロトタイプの調整あるいは作製については、有限責任中間法人検査医学標準物質機構（旧 HECTEF スタンダードレファレンスセンター)、旭化成ファーマ㈱、シスメックス㈱およびオリエンタル酵母工業㈱の協力を得た。

表1 実施態勢

項目名	学協会		標準化基本検討委員会		実試料標準物質のプロトタイプの作製
	専門委員会	委員長	検討ワーキンググループ	委員長	
血液ガス	日本臨床化学会 POCT専門委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
コリンエステラーゼ	日本臨床検査標準協議会 標準物質小委員会	桑 克彦			旭化成ファーマ(株)
グリコアルブミン	日本臨床化学会 糖尿病関連指標専門委員会	武井 泉			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
イオン化カルシウム	日本臨床化学会 POCT専門委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
ヘモグロビンA1c(HbA1c)	日本臨床検査標準協議会 標準物質小委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
総カルシウム	日本臨床化学会 POCT専門委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
総マグネシウム	日本臨床化学会 POCT専門委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
血清鉄	日本臨床検査標準協議会 標準物質小委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
尿素窒素	日本臨床検査標準協議会 標準物質小委員会	桑 克彦			HECTEFスタンダードレファレンスセンター
インスリン、C-ペプチド、コルチゾール			J2WG(産業技術総合研究所、日本糖尿病学会、日本臨床検査薬協会)	千葉 光一/桑 克彦	HECTEFスタンダードレファレンスセンター
HDL-コレステロール LDL-コレステロール			J1WG (産業技術総合研究所、日本臨床化学会、日本臨床検査薬協会)	櫻林 郁乃介/濱崎 直孝	HECTEFスタンダードレファレンスセンター
実用および血清アルブミン 尿アルブミン	日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会	美崎 英生	J3WG (産業技術総合研究所、日本臨床化学会、日本臨床検査薬協会)		シスメックス(株)
膵型アミラーゼ	日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会 P-AMYプロジェクト	白井 秀明			旭化成ファーマ(株)
血清C反応性蛋白(CRP)	日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会 CRPプロジェクト	藤田 孝			オリエンタル酵母工業(株)
リパーゼ	日本臨床化学会 酵素・試薬専門委員会 リパーゼプロジェクト	飯塚 儀明			旭化成ファーマ(株)
尿中電解質成分 尿中生化学成分			J4WG (産業技術総合研究所、日本臨床化学会、日本臨床検査薬協会)	小林 隆/桑 克彦	HECTEFスタンダードレファレンスセンター
血清無機リン、血清リチウム(Li) 血清総ビリルビン			J5WG (産業技術総合研究所、日本臨床化学会、日本臨床検査薬協会)	小林 隆/桑 克彦	HECTEFスタンダードレファレンスセンター

2-2-3　各　論

2-2-3-1　グリコアルブミン

本グリコアルブミン測定用常用標準物質についてのプロトタイプの作製については、日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会による性能規格および測定手順のプロトコルにしたがって有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター(現有限責任中間法人検査医学標準物質機構)が行った。また、日常検査法でのコミュータビリティの試験は、日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会委員の施設の協力により行った。

要旨

1）設定したグリコアルブミン測定の JSCC 基準測定法により、血清標準物質の認証値とその不確かさを求めた。その結果、本血清標準物質の認証値は、レベル１および２についてそれぞれ 258 ± 8 mmol/mol、471 ± 13　mmol/mol となった。

2）本血清標準物質のコミュータビリティについて検討した。その結果、コミュータビリティの評価には NCCLS のガイドラインを参考にし、Passing–Bablok の直線回帰式を適用したところ、グリコアルブミンの日常検査法（単位は%であるが、図２では比較のためそれを 10 倍して mmol/mol として示す）との関係において、標準物質と実試料の回帰式は同じであり、かつ標準物質のばらつきは、実試料のばらつきの 95%信頼区間にはいっており、本標準物質にはコミュータビリティがあることが確認できた。

１．目的

平成 18 年度成果報告では、同位体希釈質量分析法（ID/MS）により、血清中糖化リジンを測定し、総アルブミンは BCP 法により求め、糖化リジンから換算した糖化アルブミン量に対する比をグリコアルブミンとする認証値とその不確かさを求めた。又、作製したグリコアルブミン測定用常用標準物質の均質性、保存安定性、およびコミュータビリティについて報告した。

本年度では、以下の２点について主に実施した。

1）日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会によりグリコアルブミン測定の JSCC 基準測定法が確立されたことからその基準測定法による作製した標準物質の認証値とその不確かさを求めること。

2）基準測定法では総アルブミンをアミノ酸（リジン）を ID/MS で測定して定量する。値決めした標準物質についてコミュータビリティを実証すること。

２．委員会の構成

昨年と同じ構成で行った。

３．委員会の開催

①第一回会合：2007/05/10

②第二回会合：2007/09/23

③第三回会合：2007/10/22

④第四回会合：2007/11/24

⑤第五回会合：2008/01/10

４．グリコアルブミン測定用常用標準物質の作製と表示値

本研究で用いた標準物質の調製方法を以下に示す。

４-１　調製する試料の性状

15～50 mmol/mol の範囲で 2 レベルとする。おおよそ濃度範囲は以下の通り。

レベル１：　150 ～ 250 mmol/mol

レベル２：　300 ～ 500 mmol/mol

総タンパク、アルブミン、コレステロール、中性脂肪 いずれも基準範囲内のもの。

アンモニア性窒素　　0.2 mmol/l 以下とする。

４-２　調製方法

採血後 1 週間以内のヒト血清であって、グリコアルブミン濃度 150～500 mmol/mol のを集め、それと 150～250、300～500 mmol/mol に仕分けし、それぞれについて、混合後十分撹拌し、ろ過器を用いてろ過後分注し、－ 70 ℃以下で保存する。

５．同位体希釈質量分析法によるグリコアルブミンの測定方法

本法の詳細については、日本臨床化学会　糖尿病関連指標専門委員会「グリコアルブミン測定の標準法の確立」プロジェクトによる報告書“ グリコアルブミン測定の JSCC 基準測定法 ”に記載されている。その概要を以下に記す。

５-１　測定法の原理

本法は、血清のアルブミン分画を加水分解して遊離した全てのデオキシフルクトシルリジン（N^{ε}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine, DOF-Lys）およびリジンを同位体希釈質量分析法（ID-MS）で同時に測定するグリコアルブミン（GA）測定法である。

GA 値は遊離した全デオキシフルクトシルリジンとアルブミンのモル比（単位：mmol／mol）として式（1）で表わす。

GA値 = 全デオキシフルクトシルリジン量／アルブミン量　　（式1）

全リジン量を59（血清アルブミン分子中のリジン残基数）で除してアルブミン量とすると、GA値は式（2）で求められる。

GA値 ＝59×（全デオキシフルクトシルリジン量）／全リジン量　　（式2）

本法は以下の手順で測定する。

① イオン交換カラムによる血清からアルブミンの単離
② 内部標準物質（$^{13}C_6$-DOF-Lys 安定同位体および D_4-リジン安定同位体）の添加
③ 水素化による DOF-Lys の安定化処理
④ 塩酸によるアルブミンの加水分解
⑤ 減圧乾燥による遊離したアミノ酸の回収
⑥ 液体クロマトグラフィ-質量分析（ LC-MS）による DOF-Lys およびリジンの同位比測定
⑦ アルブミン画分中の全 DOF-Lys 量、全リジン量をそれぞれ求め GA 値を計算

水素化と加水分解によるグリコアルブミンの糖化部位の変化を図１に示した。

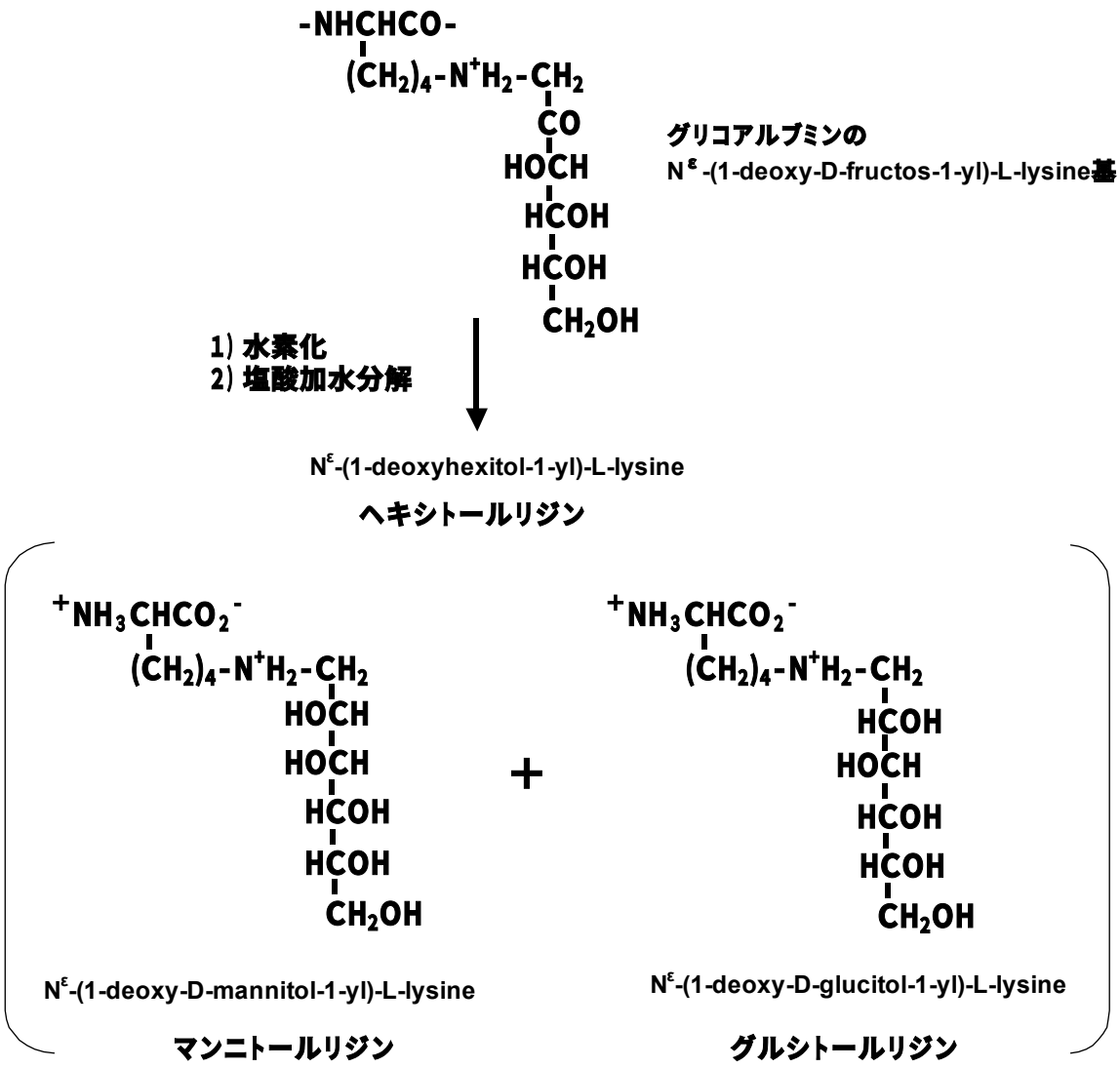


図１　グリコアルブミンの糖化部位の前処理法

5-2　定義

上記測定法によって得られるグリコアルブミンについては、プロジェクト報告書では、次のように定義されている。

1）グリコアルブミンの定義

グリコアルブミンはグルコースが結合したリジン残基、

（N^{ε}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine）を有するアルブミンとする。

2）グリコアルブミン値

グリコアルブミン値はアルブミンの N^{ε}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine とアルブミンのモル比とする。

3）グリコアルブミン値の単位

グリコアルブミン値の単位は mmol/mol とする。

4）グリコアルブミン測定の基準測定操作法

グリコアルブミン測定の基準測定操作法は、アルブミンを加水分解して遊離する N^{ε}-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-L-lysine とリジンを同時に測定する同位体希釈質量分析法（ID-MS 法）とする。

6．結果

作製した標準物質の表示値、および、その不確かさを以下に示す。

項 目	レベル１	レベル２	単位
グリコアルブミン	258　±　8	471　±　13	mmol/mol

不確かさは ISO 指針（GUM:計測における不確かさの表現ガイド）に従って求め、拡張不確かさ（信頼水準 95 %）で表した。拡張不確かさは、測定の不確かさ、DOF-Lys とリジンの高純度品の不確かさ、および測定試料調製の不確かさを合成し、それに包含係数 2 を乗じて求めた。

7．コミュータビリティ

一般に実試料標準物質は、目的とする検体とマトリックスが同じであることが要求される。日常法によっては、原料の性状に鋭敏に反応する場合がある。このことから、実試料標準物質は通常の検体と性質が同じであって、対象とする測定法による検体の測定値に、標準物質の表示値が移行できなければならず、それが示されればその標準物質はコミュータビリティがあるといえる。

コミュータビリティの評価には NCCLS のガイドラインを参考にすることとし、ガイドラインの基礎をなす Passing – Bablok の直線回帰式を用いた（図２）。

図２から、グリコアルブミンの日常検査法（単位は%であるが、図２では比較のためそれを 10 倍して mmol/mol として示す）との関係において、標準物質と実試料の回帰式は同じであり、かつ標準物質のばらつきは、実試料のばらつきの 95%信頼区間にはいっていることから、本標準物

質にはコミュータビリティがあると言える。

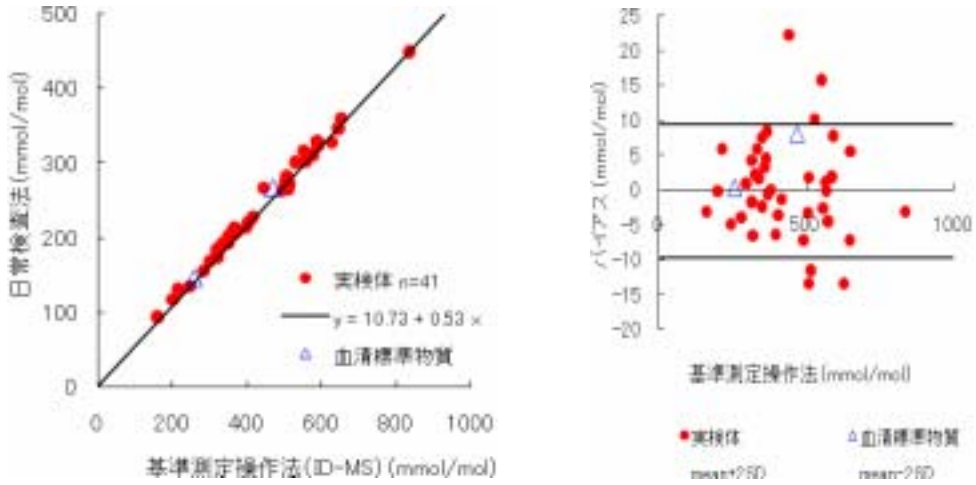


図２　グリコアルブミンのコミュータビリティ評価

８．結論

本調査研究では、日本臨床化学会糖尿病関連専門委員会のグリコアルブミンの定義、および、基準測定法に従ってグリコアルブミン測定用常用標準物質の研究を行った。表示値の測定方法、保存安定性、コミュータビリティ等において、常用標準物質としての要件を満たすグリコアルブミン測定用常用標準物質が確立できた。

文献

1) Kouzuma T, Usami T, Yamakoshi M, Takahashi M, Imamura S: An enzymatic method for the measurement of glycated albumin in biological samples, Clin Chim Acta, 324: 61-71, 2002.

2) Shima K, Ito N, Abe F, Hirota M, Yano M, Yamamoto Y, Uchida Y, Noguchi K: High-performance liquid chromatographic assay of serum glycated albumin, Diabetologia, 31: 627-631, 1988.

3) Paul J. Thornalley, Annika Langborg, Harjit S. Minhas: Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose, Biochem J, 344: 109-116, 1999.

4) Phillip P. Minghett, Duane E. Ruffner, Wun-Jing Kusang, Oliva E. Dennison, James W. Hawking Wanda G. Beattie et al.: Moleculer Structure of human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4, The Journal of Biologycal Chemistry, 261(15): 6747-6767, 1986.

5) John W. Baynes, Suzanne R. Thorpe, Martha H. Murtiashaw: Nonenzymatic glucosylation of Lysine Residues in albumin, Methods in Enzymology, 106: 88-98, 1984.
6) Piraud M, C. Vlaney-Saban, K. Petritis, C. Elfakir, J. P. Steghens, D. Bouchu: Ion-pairing reversed-phase liquid chromatography/ electrospray ionization mass spectrometric analysis of 76 underivatized amino acids of biological interest: A new tool for the diagnosis of inherited disorders of amino acid metabolism, Rapid Commun Mass Spectrom, 19(12): 1587-1620, 2005.
7) Nalia Ahmed, Ognian K. Argirov, Harjit S. Minhas, Carlos A. A. Cordeiro, Paul J. Thornalley, Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nε-carboxymetyl-lysine and Nε-(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin, Biochem J, 364:1-14, 2002.
8) NCCLS. Method Comparison and bias estimation using patient samples; approved guidelines. Document EP 9 - A (ISBN 1-5 6 2 3 8-2 8 3-7) 1995 NCCLS Wayne, PA.
9) Passing H, Bablok W, J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20, 1984;22:431-45

2-2-3-2　ヘモグロビン　A1c （HbA1c）

本 HbA1c 測定用常用標準物質についてのプロトタイプの作製については、日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会（富永真琴委員長）による性能規格および測定手順のプロトコルにしたがって有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター(現有限責任中間法人検査医学標準物質機構)が行った。また、日常検査法での性能評価試験のためのプロトコルおよび評価試料の作製は、日本臨床化学会糖尿病関連指標専門委員会委員の施設の協力により行った。さらに、日常検査法による総合的な不確かさの評価実験および評価基準の設定は、JCCLS 認証委員会標準物質小委員会（桑　克彦小委員長）で行った。

要旨

1）標準物質に必須のコミュータビリティの評価を行った。

2）ADA、EASD、IDF および IFCC の国際学術 4 団体による HbA1c のトレーサビティ体系と HbA1c の単位に関するコンセンサス・ステートメントが出されたことから、それに合致した標準物質の設定を行った。

3）上記ステートメントに合致した標準物質の開発において、IFCC レファレンス法による測定値と、JDS 校正 KO500 法による JDS 値との関係式を設定した。

4）上記ステートメントでは、米国の HbA1c に関する標準化機構である NGSP にトレーサブルな値と、IFCC 値との関係式を設定しており、IFCC 値を求めればその関係式（IFCC-NGSP 換算式）によって NGSP 値が得られる。それを換算 NGSP 値として、IFCC 値とともに報告するように求めている（IFCC 値の単位は mmol/mol であり換算 NGSP 値の単位は%である）。すなわち、IFCC 値、換算 NGSP 値、および、JDS 値の 3 つが存在することになる。この 3 つが問題なく整合するか否かについて、作製した標準物質を用いて検証した。

1．目的

平成 18 年度成果報告書では、HbA1c 測定用常用標準物質を作製し、JDS（日本糖尿病学会）校正の KO500 法による認証値の測定とその不確かさを求めた。また、作製した標準物質を用いて、均質性および保存安定性について報告した。

本年度では、以下の点に重点をおいて研究を実施した。

課題 1. 標準物質に必須のコミュータビリティの評価を行うこととする。

課題 2．ADA、EASD、IDF および IFCC の国際学術 4 団体による HbA1c のトレーサビティ体系と HbA1c の単位に関するコンセンサス・ステートメントが出されたことから、それに合致した標準物質の設定を行うこととする。

課題 3. 上記ステートメントに合致した標準物質の開発において、IFCC レファレンス法による測定値と、JDS 校正 KO500 法による JDS 値との関係式を設定する。

課題 4．上記ステートメントでは、米国の HbA1c に関する標準化機構である NGSP にトレーサブルな値と、IFCC 値との関係式を設定しており、IFCC 値を求めればその関係式

（IFCC-NGSP換算式）によってNGSP値が得られる。それをNGSP換算値として、IFCC値とともに報告するように求めている（IFCC 値の単位は mmol/mol であり換算 NGSP 値の単位は%である）。すなわち、IFCC 値、換算 NGSP 値、および、JDS 値の３つが存在することになる。この３つが問題なく整合するか否かについて、作製した標準物質を用いて検証する。

２．委員会の構成

昨年と同じ構成で行った。

３．委員会の開催

第一回会合:	2007/5/17	18:00-20:00
第二回会合:	2007/7/7	8:00-11:00
第三回会合:	2007/9/23	17:00-19:00
第四回会合:	2007/11/24	8:00-10:00
第五回会合:	2008/1/10	12:00-16:00

4. 課題 1.　コミュータビリティの評価

一般に実試料標準物質は目的とする検体とマトリックスが同じであるが、標準物質に長期間の保存安定性をもたせる場合、例えば全血のように非常に壊れやすいものは溶血させたヘモグロビン溶液で代用するので、検体とマトリックスが同じにはならない。また、通常の検体（平均的性状）とマトリックスが同じであったとしても、異常検体と同じマトリックスとは言えない。このように、実試料標準物質と検体との性質が全て同じでなくても、対象とする測定法による検体の測定値がその標準物質の表示値にトレーサブルであれば、それはコミュータビリティがあるといえる。コミュータビリティの評価には、CAP(College of American Pathologists)の方法が一般的に用いられる。本研究では、CAP の方法の基礎をなす Passing‐Bablok の直線回帰式を用いてコミュータビリティを評価した。

図1に示すように、実用基準分析法であるKO500法と、日常法であるHPLC法およびラテックス凝集免疫法による値を、それぞれプロットすると実検体のばらつきの95%信頼区間内に、標準物質5レベルがいずれも入っておりコミュータビリティがあることがわかる。

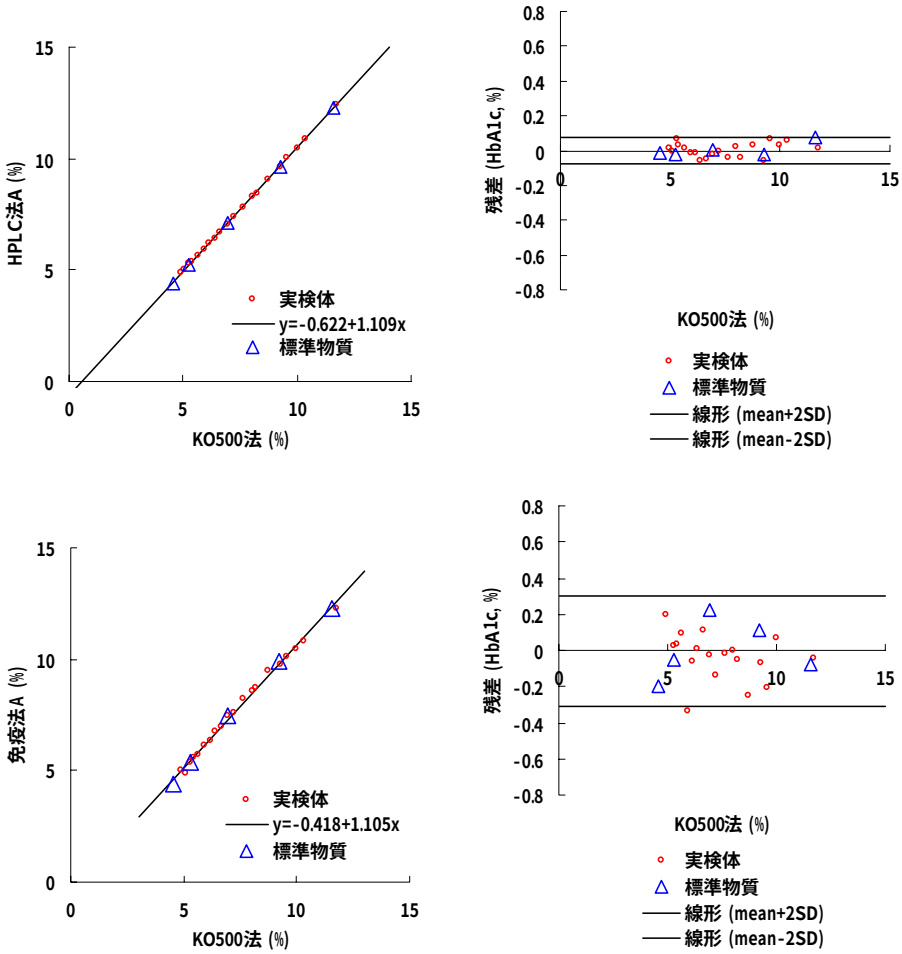


図１　HbA1cのコミュータビリティ評価

5. ADA,EASD,IFCC,IDFによるHbA1c測定の国際標準化に関するコンセンサス･ステートメントについて

2007年6月にアメリカ糖尿病協会(American Diabetes Association：ADA)、ヨーロッパ糖尿病学会(European Association for the Study of Diabetes：EASD)、国際臨床化学連合(International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine：IFCC)、国際糖尿病連合(International Diabetes Federation：IDF)はHbA1c測定の国際標準化に関するコンセンサス･ステートメントを発表した。ポイントは以下に要約できる。

① HbA1cの測定体系と測定値の報告については、国際的に標準化されるべきである。
② HbA1cの測定はIFCC法を基準測定法とする測定体系によって標準化する。

③ HbA1c 測定値の報告は国際的には IFCC 値（単位：mmol/mol）および、IFCC-NGSP 関係式により得られる NGSP 値（単位％）を併記する（NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program）。

④ 現在行われている HbA1c と平均血糖値との相関に関する研究で、それが基準をみたせば HbA1c 測定値の解釈のために”HbA1c 換算平均血糖値”(A1c derived average glucose, ADAG)も報告することになるであろう。

⑤ 臨床ガイドラインに盛り込まれる治療目標としての HbA1c は IFCC 値(mmol/mol)、換算値 NGSP 値（%）、そして将来的には ADAG として表されるべきである。

このコンセンサス・ステートメントによれば、HbA1c は IFCC のペプチドマッピング法を基準測定法とする体系により国際的に標準化され、その値の方向は、国際的には IFCC 単位（mmol/mol）、および、それを％に換算した換算 NGSP 単位(%)を併記することとなっている。ここで、IFCC 単位（mmol/mol）から換算 NGSP 単位（%）を求めるには次の式を用いる。

換算 NGSP 値（%）＝0.0915×IFCC 値(mmol/mol) + 2.15

この式によれば、IFCC 値がわかれば、上式によってそれを％に換算した値、すなわち換算 NGSP 値を得ることが出来る。これを具体的に測定の現場で行うには、IFCC 単位（mmol/mol）で認証値を表示した標準物質が確立され、それによって、測定試薬、および、装置を校正し、次に、検体の測定がなされる必要がある。すなわち、まず IFCC 単位によって認証値を表示した IFCC 法 HbA1c 常用標準物質が確立されねばならない。本調査研究ではその確立のために、標準物質の試作を行い、それを IFCC 法 HbA1c 対照試料と呼ぶこととした。

（1） IFCC 法 HbA1c 対照試料

① 設定の方法

HbA1c として 5 レベルになるように調整したヘモグロビン溶液について、IFCC HbA1c レファレンスラボラトリーネットワークの 5 施設が、IFCC の HbA1c 基準測定法による測定を行い、IFCC 値（mmol/mol）を決定する。

② 対照試料の性状

調製した対照試料は以下の規格を満足するものである。

HbA1c 濃度　25～110 mmol/mol 範囲内であって、 25～35, 35～40, 50～60, 70～80, 100 以上の5レベル

総 Hb 濃度　140±10 g/L

HbF< 1%

MetHb < 6%

グルタチオンアダクト < 0.5%

異常 Hb　　含まれないこと
血漿成分　　含まれないこと

③ 調製方法

原料全血よりまず異常ヘモグロビンを含まないヒト全血を分別する。その中から HbA1c の低濃度 25～35 mmol/mol のものを 200 mL 集める。これとは別に, 35～40 および, 100 mmol/mol 以上のものを区分けする。これらの原料それぞれを遠心分離して血漿を除き、生理食塩水で洗浄を繰り返して洗浄赤血球を得る。それらの HbA1c 測定を行いながら低濃度のものと、他の区分とを適度に混合し、特定の赤血球に偏らないようにブレンドして, 35～40, 50～60, 70～80 mmol/mol をそれぞれ調製する。別に 100 mmol/mol 以上のものをとりおく。次に、それぞれを分注し－80 ℃で凍結させる。

④ IFCC 値 (mmol/mol) および不確かさ

本 IFCC 法 HbA1c 対照試料の IFCC 値および不確かさは以下の通りである。

表 1　　単位：mmol/mol

種類	IFCC 法 HbA1c 表示値	拡張不確かさ
レベル 1	30.3	± 0.8
レベル 2	37.9	± 0.7
レベル 3	55.8	± 1.1
レベル 4	78.5	± 1.3
レベル 5	103.7	± 1.7

拡張不確かさは ISO の指針 (計測における不確かさの表現のガイド) に従って、測定の基準とした IFCC 一次キャリブレータの不確かさと測定誤差成分を合成して、拡張不確かさ (95%信頼水準、包含係数 2) として示した。

(2) 測定方法および測定施設

IFCC 一次キャリブレータ (IFCC HbA1C レファレンスラボラトリーネットワークより入手) を用いて IFCC 基準分析法により測定した。測定は、CDC (米国)、検査医学標準物質機構、INSTAND e.V. (ドイツ)、慶應義塾大学医学部付属病院、および、病態解析研究所で行った。これらの施設は、IFCC HbA1c(IFCC Working Group on HbA1c Standardization)レファレンスラボラトリー (基準測定施設) である。

6. 課題2.　前記ステートメントに合致した標準物質の開発においては IFCC レファレンス法による測定値と、JDS 校正 KO500 法による JDS 値との関係式を設定する。

国際学術4団体によるステートメントにおいては、IFCC 単位 (mmol/mol) と換算 NGSP 単位 (%) との 2 つを併記することとなっている。しかしながら、我が国においては日本糖尿病学会の糖尿病関連検査の標準化に関する委員会において設立された、HbA1c 測定用の実試料標準物質 JDS Lot 1、および、

JDS Lot 2 によって標準化が行われており、臨床への報告は、それらにトレーサブルな測定値（JDS 値）で行われている。これをステートメントに従って、IFCC 単位、および、換算 NGSP 単位で行うとすれば、大きな混乱が予想される。そこで、日本臨床化学会の糖尿病関連指標委員会では、HbA1c 測定値の臨床報告は IFCC 値（mmol/mol）、および、JDS 値（%）の両方を並記する旨の見解を出している。この見解を実施するに当たっては、それぞれ標準物質を基準にして得られる IFCC 値と JDS 値が、常に一定の関係にあることを検証できる関係式が不可欠である。この関係式については、調製した IFCC 法 HbA1c 対照試料について、JDS の HbA1c レファレンスラボラトリーである4施設により JDS 値を求めて、回帰式を算出した結果、次式が得られた。

JDS 値（%）= 0.0963×IFCC 値（mmol/mol） + 1.62　　式 (1)

7. 課題3. IFCC-NGSP 関係式から得られる換算 NGSP 値（%）を IFCC 値（mmol/mol）を出発点として、NGSP HbA1c 対照試料を用いて検証する。

IFCC HbA1c WG では 2001 年から 2007 年の 6 年間にわたり IFCC 値（%）と NGSP 値（%）との関係式を求め、そのデータをもとに、Master Equation(IFCC-NGSP 換算式)として次式を得ている。

NGSP(%) = 0.9148×IFCC(%) + 2.152

これを IFCC 単位である mmol/mol で書き直し、係数を四捨五入すると

換算 NGSP(%) = 0.0915×IFCC(mmol/mol) + 2.15　　式(2)

となる。すなわち換算 NGSP 値（%）は、IFCC 値（mmol/mol）を式（2）に代入すれば求められる。

ここで、式（2）による換算 NGSP 値（%）が、実際に米国の標準化組織である NGSP の値と整合するか否かについて検証を行う必要がある。そのために、作製した IFCC 法 HbA1c 対照試料で校正した KO500 法、同じく校正した代表的日常法2種（免疫法、および HPLC 法）によって、別途に作製した NGSP HbA1c 対照試料を測定し、その NGSP 表示値と、（2）式によって得られる換算 NGSP 値（%）とを比較することとした。ここで用いる NGSP HbA1c 対照試料の規格および性状は IFCC 法 HbA1c 対照試料と同じであるが、調製方法は異なる。それを以下に示す。

（1） NGSP HbA1c 対照試料

① 調製方法

原料全血よりまず異常ヘモグロビンを含まないヒト全血を分別する。その中から、HbA1c の低濃度 4.5～5.5%のものを 200 mL 集める。これとは別に, 5.5～6.5%、および, 10%以上のものを区分けする。この3種のものを、それぞれについて遠心分離後、全血上清である血漿部分を生理食塩水で置換する。 測定を行いながら、低濃度のものと、5～7%,10%以上の種々の区分とを適度に混合しな

がら、特定の赤血球に偏らないようにブレンドして、5.5～6.5, 7～8, 9～10%をそれぞれ調製する。別に 10%以上のものをとりおく。次に、それぞれに水を分注後、－80℃で凍結させる。

② NGSP 表示値および不確かさ

表 2　　単位：HbA1c (%) (米国 NGSP 値)

種類	NGSP 表示値および拡張不確かさ
レベル1	5.1 ± 0.1
レベル 2	5.7 ± 0.1
レベル 3	7.4 ± 0.2
レベル 4	9.4 ± 0.2
レベル 5	11.3 ± 0.3

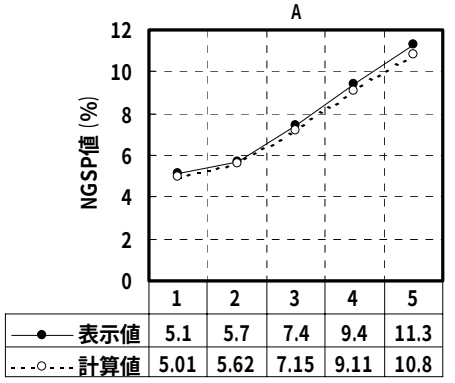
注) 不確かさは、測定の標準不確かさのみを求め、拡張不確かさ (k=2) で示した。

(表示値の測定方法および測定施設)

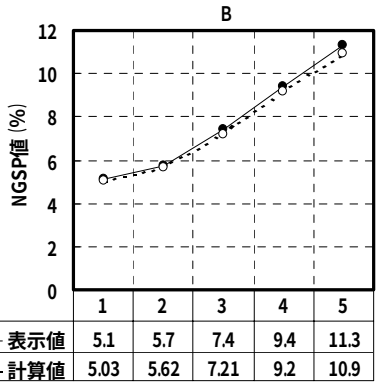
HbA1c の表示値の測定は、Univ. of Missouri の2施設、 Univ. of Minneapolis, Core Lab for Clinical Studies の 4 施設で実施した。

上記 NGSP 表示値 (認証値) と、式 (2) で得られた換算 NGSP 値との比較を図2～3に示す。これらの図からわかるように KO500 法、および、日常法において、NGSP 値と換算 NGSP 値は、高値でかい離が見られる。レベル 3 (7. 4%) およびレベル 4 (9. 4%) では、換算値が HbA1c として 0.1～0.2%低値を示している。レベル5 (11. 3%) においては、HbA1c として 0. 4%低値となっている。

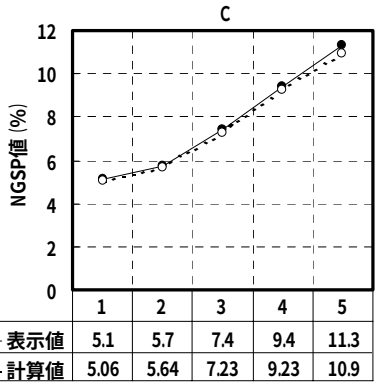
レベル 1 から2では差はみられない。KO500 法および日常法いずれにおいても、同じかい離の傾向が見られたので、NGSP 値と換算 NGSP 値との間には高値において差が存在していることがわかる。これについては、NGSP 表示値について、さらに確度を上げた測定を行う必要があると結論づけられる。しかし、別の見方をすれば、両者の間にはレベル 1 から 4 では 0. 2%程度の差しかないことになり、その認識の下に NGSP 表示値を用いるようにすればよいとも言える。



	1	2	3	4	5
表示値	5.1	5.7	7.4	9.4	11.3
計算値	5.01	5.62	7.15	9.11	10.8



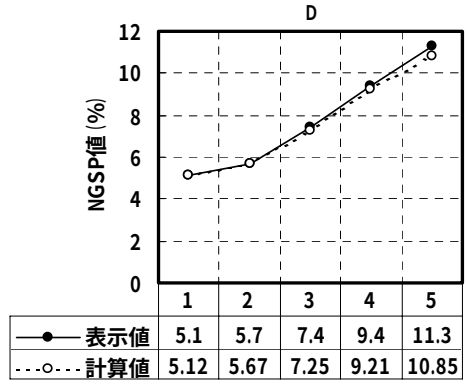
	1	2	3	4	5
表示値	5.1	5.7	7.4	9.4	11.3
計算値	5.03	5.62	7.21	9.2	10.9



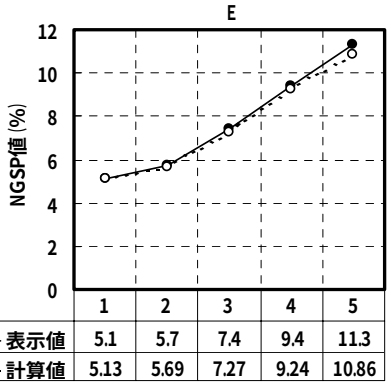
	1	2	3	4	5
表示値	5.1	5.7	7.4	9.4	11.3
計算値	5.06	5.64	7.23	9.23	10.9

図２　NGSP 表示値と式（２）により計算した換算 NGSP 値の比較（KO500 法）

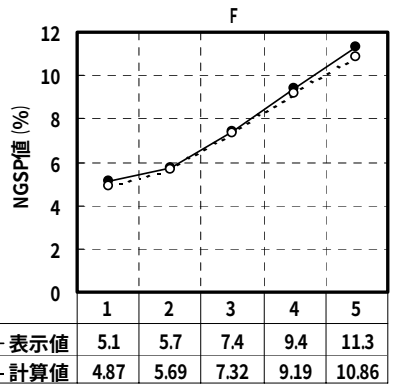
＊横軸はレベルを指す



	1	2	3	4	5
表示値	5.1	5.7	7.4	9.4	11.3
計算値	5.12	5.67	7.25	9.21	10.85



	1	2	3	4	5
表示値	5.1	5.7	7.4	9.4	11.3
計算値	5.13	5.69	7.27	9.24	10.86



	1	2	3	4	5
表示値	5.1	5.7	7.4	9.4	11.3
計算値	4.87	5.69	7.32	9.19	10.86

図 3　NGSP 表示値と式（２）により計算した換算 NGSP 値の比較（日常法）

＊横軸はレベルを指す

8. 課題4．IFCC-JDS 関係式から得られる換算 JDS 値（%）が JDS 値と整合するか否かを IFCC 値（mmol/mol）を出発点として、HbA1c 測定用常用標準物質（JDS 単位）を用いて検証する。

課題3で求めたように、IFCC 値（mmol/mol）と換算 JDS 値（%）との関係式は

$$JDS(\%) = 0.0963 \times IFCC\ (mmol/mol) + 1.62 \qquad 式\ (3)$$

で与えられる。我が国では、日本糖尿病学会において、の HbA1c の標準化がおこなわれており、1995 年に設定された HbA1c 測定の標準物質である JDS Lot 1 と、それを引き継ぐ JDS Lot 2 にトレーサブルな値が、JDS 値（%）として臨床的に用いられている。そこで、式（3）による換算 JDS(%)が、現実に臨床的に用いられている JDS 値(%)と整合するかどうかについて検討しなければならない。そのための実験計画として、

① 作製した IFCC 法 HbA1c 対照試料で校正した KO500 法、同じく校正した代表的日常法2種（免疫法、および HPLC 法）によって、表3の HbA1c 測定用常用標準物質（JDS 単位）を測定して、その IFCC 値を求める。

② 前記①によって得られた IFCC 値（mmol/mol）を式(3)に代入し、換算 JDS（%）を求める。
HbA1c 測定用常用標準物質の JDS 値（%）と b)で求めた換算 JDS(%)とを比較し、整合性を調べる。

に従って、検討を行った。その結果を図4に示す。図4は、得られたデータの差のプロットである。これから、IFCC 値を出発点とし、IFCC-JDS 換算式である式（3）から得られた換算 JDS 値と HbA1c 測定用常用標準物質の表示値との差は 0.1%以下であり、両者は極めてよく一致している。

表 3　HbA1c 測定用常用標準物質の表示値　（単位： JDS %）

種　　類	HbA1c 表示値	拡張不確かさ
レベル 1	4.54	± 0.05
レベル 2	5.27	± 0.06
レベル 3	6.96	± 0.08
レベル 4	9.24	± 0.10
レベル 5	11.58	± 0.13

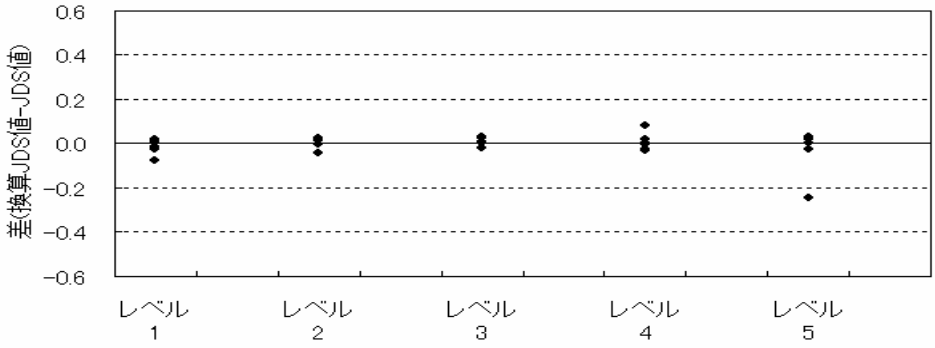


図４　式(3)による換算 JDS 値と JDS 表示値の差のプロット

９．結論

本調査研究では、健常人のヘモグロビンから作製した HbA1c 測定用常用標準物質の研究を行った。測定方法としては JDS 校正の KO500 法を採用し、保存安定性に優れ、コミュータビリティを有した常用標準物質が確立できた。HbA1c については IFCC が国際標準化を行っているので、本研究では IFCC の HbA1c 基準測定法による値、すなわち IFCC 単位（mmol/mol）にトレーサビリティをつける体系にそった標準物質の確立を目的とした。IFCC HbA1c 基準分析法による値（IFCC 値）を出発点として、得られた JDS 値および NGSP 値は IFCC・JDS 換算式および、IFCC-NGSP 換算式によく整合した。従って、本調査研究による HbA1c 測定用常用標準物質を用いれば、IFCC 単位（mmol/mol）へのトレーサビリティが得られることが結論づけられた。

文献

1) 日本臨床化学会　糖尿病関連指標専門委員会　ADA, EASD, IFCC, IDF によるヘモグロビン A1c 測定の国際標準化に関するコンセンサス・ステートメントに対する糖尿病関連指標専門委員会の見解　臨床化学：36, 310-313, 2007.

2) Jeppsson JO, et. Al: Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in Human blood. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 78-89

3) Passing H, Bablok W: J Clin Chem Clin Biochem 1984; 22: 431-445

4) 宮下徹夫、他. HbA1c 測定における精確さの伝達の仕方と患者試料での互換性確認の方法案. 臨床化学 35（補冊 1）：7‐ 8，2006

5) 富永真琴、他. 日本臨床化学会 糖尿病関連指標専門委員会「HbA1c 測定のためのレファレンスラボラトリー設定指針」臨床化学 36(1)：67‐ 73，2007

6) KO500 法と JSCC 実用基準法の概要，日本臨床化学会関東支部学術例会予稿集（2000 年 10 月）

7) Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9,1st Ed. ISO., Geneva, Switzerland(1993)

8）富永真琴, ヘモグロビン A1c 標準物質，臨床病理, 49(12), 1199-1204 (2001)
9) 富永真琴 他 (糖尿病関連検査の標準化に関する委員会) , ヘモグロビン A1c 標準物質 JDS Lot 2 の NGSP 値について，糖尿病, 45(5), 385-388 (2002)
10) Tominaga M, et al. (Committee on Standardization of Laboratory Testing Related to Diabetes Mellitus of Japan Diabetes Society), Japanese standard reference material for JDS Lot 2 haemoglobin A1c. Ⅰ:comparison of Japan Diabetes Society-assigned values to those obtained by the Japanese and USA domestic standardization programmes and by the International Federation of Clinical Chemistry reference laboratories, Ann Clin Biochem, 42, 41-46 (2005)
11) Tominaga M, et al. (Committee on Standardization of Laboratory Testing Related to Diabetes Mellitus of Japan Diabetes Society), Japanese standard reference material JDS Lot 2 for haemoglobin A1c. Ⅱ:Present state of standardization of haemoglobin A1c in Japan using the new reference material in routine clinical assays, Ann Clin Biochem, 42, 47-50 (2005)
12) 富永真琴 他（糖尿病関連検査の標準化に関する委員会）,国際標準化と関連した HbA1c に関する本邦のアンケート調査，糖尿病, 48(7), 541-547 (2005)
13) NCCLS. Method Comparison and bias estimation using patient samples; approved guidelines. Document EP 9 - A (ISBN 1-56238-283-7)1995 NCCLS Wayne, PA.
14) Passing H, Bablok W, J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20, 1984;22:431-45

2-2-3-3　血清鉄

本血清鉄測定用常用標準物質についてのプロトタイプの作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター(現有限責任中間法人検査医学標準物質機構)が行った。

要旨

1）国際的に評価の得られた認証標準物質がないため、ICSH 国際標準法の妥当性を評価する実験を行った。その結果、国際標準法での除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差は、いずれも約 5 %であった。しかし、測定する血清中のタンパク濃度によってはこの値は変化する。また、除タンパク処理での血清の希釈倍数を 8 倍以上に高めれば、血清鉄濃度が 100 μg/dL 以下の検体では測定する吸光度が 0.01 以下に低下して、十分な測定精度が得られないことから、国際標準法の除タンパク処理での容積置換による濃縮誤差を回避する方法としては、標準添加法で測定する方法が最も妥当であるとした。

2）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティ評価を行った。その結果、レベル 1 およびレベル 2 について、それぞれ 8.87 ± 0.32 μmol/L 、21.50 ± 0.48 μmol/L となった。また、保存安定性試は- 70 ℃、- 20 ℃保存条件で行った結果、対照として- 120 ℃保存品を同時に血清鉄の日常検査法で測定したところ、- 70 ℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また、- 20℃保管品は 3 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、4 ヶ月間で対照品よりも 2%ほど高値となった。

1．目的

平成 18 年度成果報告では、血清鉄測定用常用標準物質を作製し、ICSH 国際標準法による認証値の測定と、その不確かさについて報告した。

本年度は、

（1）国際的に評価の得られた認証標準物質がないため、ICSH 国際標準法の妥当性を評価する実験を行うこと。

（2）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティ評価を行うこと。

の 2 点について研究を実施した。

2．委員会の構成

昨年と同じ構成で行った。

3．委員会の開催

第 1 回委員会：2007/9/13

第２回委員会：2008/1/10

４．血清鉄定用常用標準物質の作製と表示値

表示値の測定方法の検証、安定性試験および、コミュータビリティ試験に用いた標準物質の仕様および調製方法を以下に示す。

４-１　調製する試料の性状

濃度　　5～30μmol/L の範囲で 2 レベルとする。おおよその濃度範囲は以下の通り。

レベル１：5　～7　μmol/L

レベル２：15　～30　μmol/L

密度　　1.022～1.025 g/cm^3 (25℃)とする

総タンパク、アルブミン、コレステロール、中性脂肪 いずれも基準範囲内のもの。

アンモニア性窒素　　0.2 mmol/ L 以下とする

４‐２　調製方法

血清鉄濃度 5～7　μmol/L であることを測定により確認したヒト血清をブレンドし、血清ろ過器を用いてろ過してレベル１とする。同様に 15～30　μmol/L であることを測定により確認したヒト血清をブレンドし、血清ろ過器を用いてろ過してレベル２とする。それぞれ、分注し、-７０℃以下で保存する。

４-３　表示値および不確かさ

調製した標準物質について、本報告書に記載の測定方法により得られた表示値と、その不確かさを以下に示す。

項　目	レベル１	レベル２	単　位
血 清 鉄	32.8　±　1.8	120.1　±　2.7	μg/dL
	5.87　±　0.32	21.50　±　0.48	μmol/L

１）不確かさは ISO 指針（GUM:計測における不確かさの表現のガイド）に従って拡張不確かさ（U,95%信頼水準）で表したもので、合成標準不確かさ(Uc)と包含係数 (k=2.0) より U=k・Uc の式で求めた。ここで Uc は測定の誤差要因（測定のくり返しおよび再現性、標準液、試料調製、容積置換分の補正、銅の干渉分の補正）のそれぞれの標準不確かさを合成したものである。

5. 安定性

本標準物質を解凍し、室温（25±2 ℃）での安定性試験を行った。対照として、 - 70 ℃保存品を室温で解凍した直後のものを用い、血清鉄の日常検査法で測定した。その結果、室温で 1、3、6 時間放置したものと- 70 ℃保存品との測定値の差はみられず、解凍した本標準物質は室温で 6 時間安定であるといえる。

保存安定性試験は- 70 ℃、- 20 ℃保存条件で行った。対照として- 120 ℃保存品を同時に血

清鉄の日常検査法で測定した。その結果、－ 70 ℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また－ 20℃保管品は 3 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、4 ヶ月間で対照品よりも 2%ほど高値となった。これは、－ 20 ℃で保存すると徐々に血清の濁りが増加して、日常検査法の測定値に影響が出たためであると考えられる。これらの結果より、本標準物質の保存期限は－ 70 ℃保存で 9 ヶ月間、－ 20 ℃保存で 2 ヶ月間とした。

６．国際標準法の妥当性

現在使用されているほとんどの日常検査法の測定原理は、血清の除タンパク処理を必要としない鉄と特異的に強く結合するキレート発色剤用いた直接法である。一方、血清鉄の国際標準法（ICSH 1978）では、図１のように血清と除タンパク液を同容量混和するため、除タンパク処理による容積置換の影響が避けられない。そのため、両者の測定値は一致しないことが問題点として指摘されていた。さらに鉄の発色剤であるバソフェナントロリンの特異性についても考慮する必要がある。このようなことから、国際標準法の妥当性試験を行った。

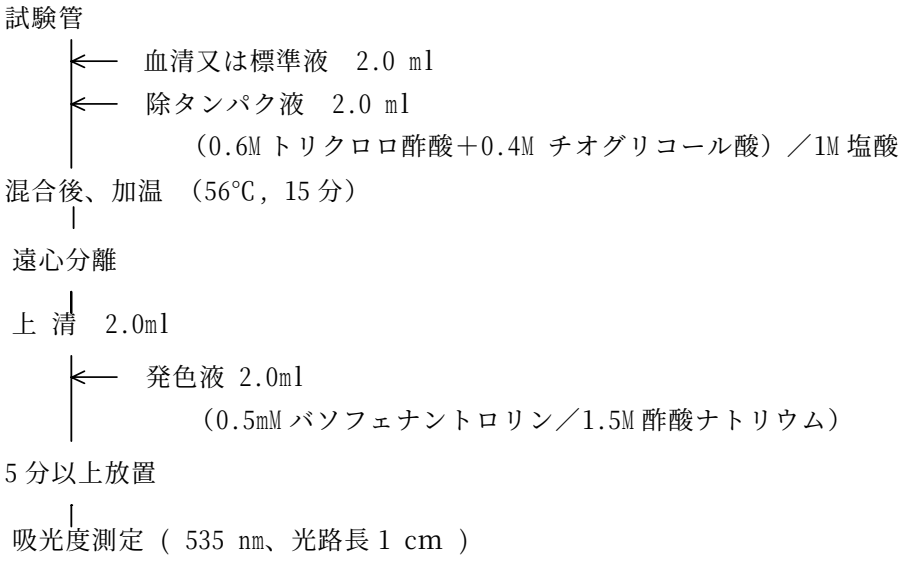


図１．国際標準法(ICSH 1978)による血清鉄測定操作手順

６－１　容積置換の補正実験

国際標準法での除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差を補正する方法として、標準添加法による補正実験と除タンパク処理での血清の希釈倍数を高める補正実験を行った。

①　標準添加法による補正

標準液と測定試料のマトリックス効果により、測定感度（検出出力／濃度）が異なると検量線法では正しく定量できない。このような測定感度の違いは標準添加法で補正でき、信頼性の高い定量ができる。国際標準法での除タンパク処理の容積置換による濃縮効果によって、血清と標準液に測定感度差が生じると考えられるので、標準添加法の実験を行いこの補正を試みた。

血清鉄常用標準物質（JCCRM 322-3M, L）を国際標準法の原法通りの検量線法と鉄標準液を添加する標準添加法で測定した。その結果、表 1 のように検量線法が相対値として 4.4～5.1 %高くなった。この測定値の違いは、除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差によるものと推定される。

表 1　血清鉄国際標準法（ICSH 1978）での検量線法と標準添加法の測定値比較

（n=36 の平均値，血清鉄　μg/dL）

常用標準物質	検量線法（A）	標準添加法（B）	（A）/（B）
JCCRM 322-3M	128.0	122.6	1.044
JCCRM 322-3L	37.1	35.3	1.051

② 除タンパク処理での血清の希釈倍数を高める補正

国際標準法の除タンパク処理での血清の希釈倍数を高めれば、相対的に容積置換による濃縮誤差が小さくなると考えられる。そこで、図 1 に示した国際標準法の測定操作において除タンパク液の量はそのままで、使用する血清の量を段階的に少なくして、血清の希釈倍数を高めて測定した。

図 2 は血清鉄濃度の高い JCCRM 322-3M を測定した結果である。希釈倍数が 8 倍以上では、ほぼ一定の測定値が得られ、その測定値は国際標準法の希釈倍数である 2 倍での測定値の 94.5～95.0 %となった。つまり、この方法から推定される国際標準法の除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差は約 5%とみなされる。

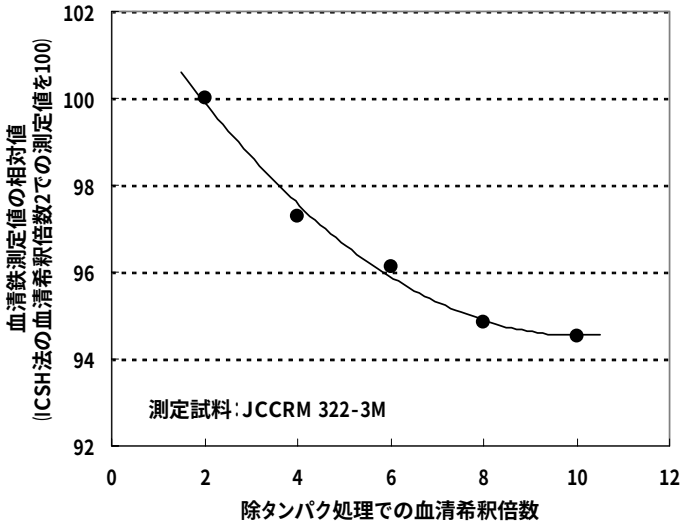


図２．除タンパク処理での血清の希釈倍数を高めたときの測定値への影響

これらの検証実験から推定される国際標準法での除タンパク処理の容積置換による濃縮誤差は

いずれも約５％といえる。しかし、測定する血清中のタンパク濃度によってはこの値は変化する。また、除タンパク処理での血清の希釈倍数を 8 倍以上に高めれば、血清鉄濃度が 100 μg/dL 以下の検体では測定する吸光度が 0.01 以下に低下して、十分な測定精度が得られない。

以上のことを考慮すると、国際標準法の除タンパク処理での容積置換による濃縮誤差を回避する方法としては、標準添加法で測定する方法が最も妥当であるとした。

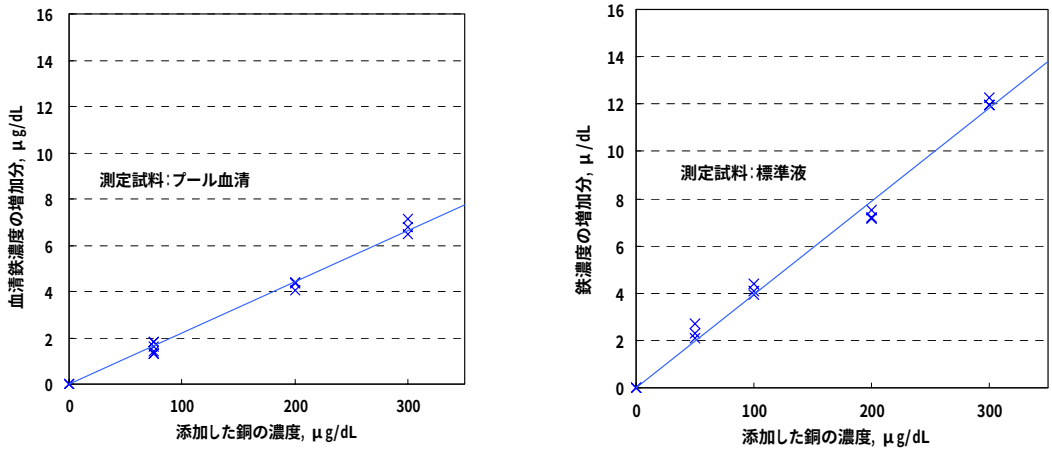
６-２　発色剤の干渉

銅は鉄と同じ遷移金属に分類され、多くの鉄のキレート剤は銅の干渉を受け易い。また血清中には血清鉄と同程度の亜鉛が含まれている。ここでは、国際標準法の鉄の発色剤であるバソフェナントロリンに対するこれらの元素の干渉について検証する。

干渉実験は国際標準法の鉄標準液に銅または亜鉛の各塩化物を添加、さらに血清にも同様に添加した試料をそれぞれ調製して国際標準法で血清鉄を測定した。干渉の評価は、同時に測定した無添加の試料と比較する方法で行った。

亜鉛については平均的な血清中の濃度（70～120μg/dL）の約３倍量（300μg/dL）まで干渉はみられなかった。しかし、銅については図３に示したようにプール血清あるいは標準液いずれにおいても、添加した銅濃度に依存する正の干渉がみとめられた。このプール血清での干渉試験の結果からは、平均的な血清中の銅濃度域（80～180μg/dL）での干渉は血清鉄濃度として 2～4μg/dL と推定される。この補正の誤差を見積もるためには、さらに詳細な追試が必要と思われる。

バソフェナントロリンのこの銅の干渉については、バソクプロイン化合物等の銅のキレート剤によるマスキング法が提案されているが、それによる分光干渉など課題も多い。　このようなことから、現状では血清中の銅濃度（約 130　μg/dL）に相当する干渉分を補正する方法が妥当であるとした。



A：血清に銅を添加　　B：標準液に銅を添加

図３．国際標準法でのバソフェナントロリンの銅の干渉試験結果

７．コミュータビリティ

血清鉄測定用常用標準物質（２ロット、計４種類）と血清の実検体（n=40）をキレート発色剤の異なる日常検査法２キットで測定して反応性評価試験を行った。いずれの標準物質も実検体と図４で示したように同様の反応性であることが確認される。コミュータビリティの評価にはNCCLS のガイドラインを参考にすることとし、ガイドラインの基礎をなす Passing – Bablok の直線回帰式を用いた。

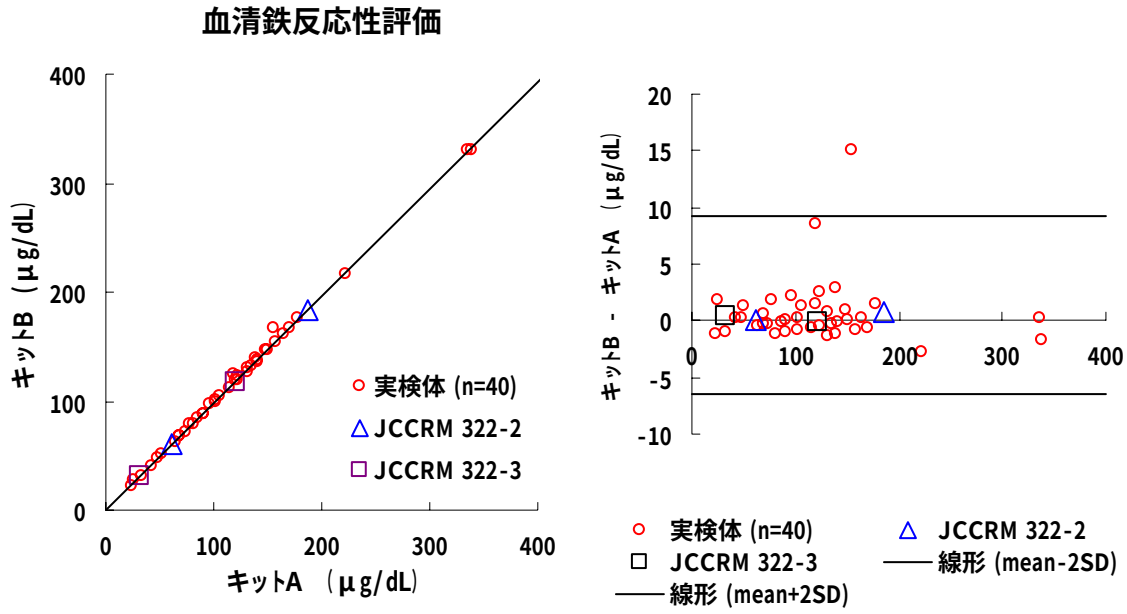


図 4．血清鉄のコミュータビリティ

８．結論

本調査研究では、血清鉄測定用常用標準物質について、保存安定性、コミュータビリティ等、常用標準物質として具備すべき要件を満足する標準物質の作製を行った。表示値の測定方法としては、ICSH 国際標準法を用いることとしたが、容積置換の誤差を消去するために標準添加法を採用した。又、ICSH 国際標準法では銅の影響があることがわかったので、本研究の表示値の測定では、血清中の銅を定量し、その干渉分を補正することとした。

このようにして国際標準法の誤差を最小化した測定方法により表示値が付された、信頼性の高い血清鉄測定用常用標準物質が確立出来た。

参考文献

1）Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed ISO.,Geneva,Switzerland(1993)

2）International Committee for Standardization in Haematology :Recommendations for Measurement of Serum Iron in Human Blood, British Jounal of Haematology, **38** :291-294(1978)

3) Iron Panel of the International Committee for Standardization in Haematology : Revised recommendations for the measurements of the serum iron in human blood, Brit. J. Haemateel., 75 : 615-616 (1990)
4) Derman D.P, et al: A systematic evaluation of bathophenanthroline, ferrozine, and ferene in an ICSH-based method for the measurement of serum iron, Ann Clin Biochem, 26: 144-147(1989)
5) NCCLS. Method Comparison and bias estimation using patient samples; approved guidelines. Document EP 9 - A (ISBN 1-56238-283-7) 1995 NCCLS Wayne, PA.
6) Passing H, Bablok W, J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20, 1984;22:431-45

2-2-3-4　尿素窒素

本尿素窒素測定用常用標準物質についてのプロトタイプの作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター(現有限責任中間法人検査医学標準物質機構)が行った。

要旨

1）作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティの評価を行った。

2）本標準物質を解凍し、室温（25±2 ℃）での安定性試験を行った。その結果、室温で 1、3、6 時間放置したものと- 70 ℃保存品との測定値の差はみられなかった。従って、解凍した本標準物質は室温で 6 時間安定であった。

3）保存安定性試験は- 70℃、- 20℃保存条件で行った。その結果、- 70℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また- 20℃保管品も 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差みられず安定であったが、血清の濁りが増加していており日常検査法の種類によっては測定値に影響が出る恐れがある。これらの結果より、本標準物質の保存期限は- 70℃保存で 9 ヶ月間、- 20℃保存で 6 ヶ月間とした。

1. 目的

平成 18 年度成果報告では、尿素窒素測定用常用標準物質を作製し、AACC（アメリカ臨床化学会）実用基準法案（ウレアーゼ/GLDH 酵素法）による認証値の測定と、その不確かさについて報告した。

本年度は、作製した標準物質について、保存安定性およびコミュータビリティの評価を行うこととした。

2. 委員会の構成

昨年と同じ構成で行った。

3. 委員会の開催

第 1 回委員会：2007/9/23

第 2 回委員会：2008/1/10

4．尿素窒素測定用常用標準物質の作製と表示値

安定性試験およびコミュータビリティ試験に用いた標準物質の仕様および調製方法を以下に示す。

4-1　調製する試料の仕様

濃度　　8～50 mg/dL の範囲で 2 レベルとする。おおよその濃度範囲は以下の通り。

レベル１：8～20 mg/dL

レベル２：20～30 mg/dL

レベル２：40～50 mg/dL

密度　　1.022～1.025 g/cm^3 (25℃)とする

総タンパク、アルブミン、コレステロール、中性脂肪 いずれも基準範囲内のもの。

アンモニア性窒素　　0.1 5mmol/L 以下とする

４-２　調製方法

尿素濃度 8～20　mg/dL であることを測定により確認したヒト血清で、アンモニア性窒素 0.15mmol/L 以下のものを血清ろ過器を用いてろ過後、2 分割する。

レベル 1 は濃度範囲が 8～20mg/dL であることを確認する。レベル 2, 3 は尿素純品(NIST SRM912a)を水に溶かした液を濃度範囲がそれぞれ 20～30, 40～50 mg/dL になるように調整し、十分撹拌する。それぞれを分注して-７０℃以下で保存する。

４-３　表示値および不確かさ

調製した標準物質について、前回報告書記載の測定方法により得られた値とその不確かさを表 1 に示す。

表１　尿素窒素測定用常用標準物質の表示値および拡張不確かさ

項　目	レベル１	レベル２	レベル２	単位（25 ℃）
尿素窒素	12.1 ± 0.3	26.4 ± 0.7	45.4 ± 1.1	mg/dL

表示認証値の不確かさは ISO 指針に従って測定の誤差成分に均質性を含めた標準不確　かさ、校正に用いた標準物質の標準不確かさおよび試料調製の標準不確かさを合成して、包含係数 2.3（95%信頼水準）を乗じて求めた。

尿素窒素の表示値は内因性のアンモニアを含まない。

５．安定性

本標準物質を解凍し、室温（25±2 ℃）での安定性試験を行った。- 70 ℃保存品を室温で解凍した直後のものを対照として、血清鉄の日常検査法で測定した。その結果、室温で 1、3、6 時間放置したものと- 70 ℃保存品との測定値の差はみられなかった。従って、解凍した本標準物質は室温で 6 時間安定であるといえる。

保存安定性試験は- 70℃、- 20℃保存条件で行った。対照として- 120℃保存品を同時に尿素窒素の日常検査法で測定した。その結果、- 70℃保存においては 10 ヶ月間まで対照品との測定値の差はみられず安定であることが確認できた。また- 20℃保管品も 10 ヶ月間まで対照品との

測定値の差みられず安定であったが、血清の濁りが増加していており日常検査法の種類によっては測定値に影響が出る恐れがある。これらの結果より、本標準物質の保存期限は－70℃保存で 9 ヶ月間、－20℃保存で 6 ヶ月間とした。

６．表示値の比較評価

本尿素窒素測定用常用標準物質（JCCRM 521-8）の表示値について、NIST SRM 909b(Human Serum)を対照として比較評価試験を行った。評価方法は JCTLM　WG1 P-04A(Process for Comparing Certified Value of the Same Measurand in Multiple Reference Material)のドキュメントに従った。

各標準物質の AACC 実用基準法案（ウレアーゼ/GLDH 酵素法）での測定値の 95%信頼区間は、図 1 のように全て認証値の不確かさの範囲内なっており、SRM 909b の ID-MS 法で付された認証値と本常用標準物質（JCCRM 521-8）の表示値との一致性がみられる。
つまり、本尿素窒素測定用常用標準物質は認証標準物質 NIST SRM 909b と比較して同等の正確さを有しているといえる。

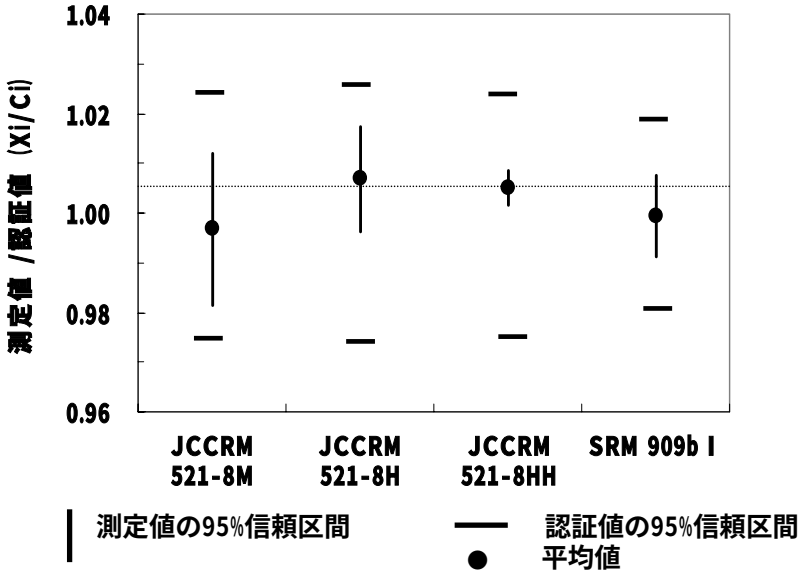


図 1　尿素窒素測定用標準物質の比較評価試験結果

７．コミュータビリティ

常用標準物質(JCCRM 521-7)と血清の実検体（n=30）を日常検査法 2 キット（いずれもウレアーゼ・GLDH-UV 法）で測定して反応性評価試験を行った。その結果は図 2 示したように、標準物質の測定値は、実検体の直線回帰式のばらつきの 95%信頼区間であることから、実検体と同様の反応性であることが確認される。コミュータビリティの評価には、

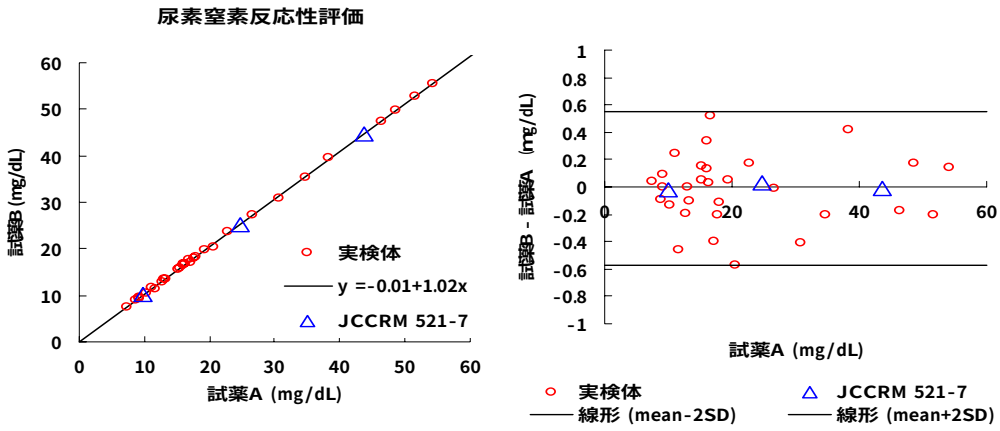


図２　尿素窒素測定用常用標準物質のコミュータビリテイ

NCCLS のガイドラインを参考にすることとし、ガイドラインの基礎をなす Passing – Bablok の直線回帰式を用いた。

８．結論

本調査研究では滅菌ろ過を慎重に行い、かつ、内因性アンモニアとして 0.15mmol/mol 以下の血清を原料として標準物質を調製した。表示値は AACC 実用基準法案（ウレアーゼ/GLDH 酵素法）により測定し、その不確かさは標準物質として十分小さく NIST SRM 909b と比較して同等の正確さを有しており、保存安定性、実検体とのコミュータビリティに優れていた。以上、本研究により信頼性の高い尿素窒素測定用常用標準物質が確立できた。

文献

1) Sampson et al: A Coupled-Enzyme Equilibrium Method for Measuring Urea in Serum: Optimization and Evaluation of the AACC Study Group on the Urea Candidate Reference Method, ClinChem, 26: 816-826 (1980)

2) NCCLS. Method Comparison and bias estimation using patient samples; approved guidelines.　Document EP 9 - A (ISBN1-56238-283-7) 1995 NCCLS Wayne, PA.

3) Passing H, Bablok W, J Clin Chem Clin Biochem 1983;21:709-20, 1984;22:431-45

2-2-3-5　インスリン

要旨

1）血清中のインスリン測定について、平成 18 年度の共同実験にて、実試料系標準物質がデータの収束性に有効性であることが示唆された。

2）実試料標準物質候補品での収束性を再確認する目的で、標準物質候補品として試料を作製し、あわせて健常人血清を測定した。

3）現在の市販試薬では１キットを除くと血清値は収束していることが再確認された。

4）血清測定値と実試料標準測定値と挙動が異なる試薬が確認されている為、実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる２試薬を用い、各試薬の校正を実施した結果、その優位性はなく、各試薬共に収束性が確認された。

5）試作した実試料標準物質が常用標準物質としてその有用性が実証できた。

1．目的

インスリン標準化のため実試料系標準物質のプロトタイプを作製する。併せて実試料系標準物質候補品での測定値収束性の再確認をした後に、性状規格、基準測定操作法、値付けの手順、認証値と不確かさ等も含めて実試料系標準物質の作成プロトコルを完成させる。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者/アドバイザー	桑　　克彦	筑波大学大学院人間総合科学研究科
運営管理者（臨薬協）	望月　克彦	富士レビオ株式会社
柱 1／J2 担当	藤橋　和夫	日本臨床検査標準協議会
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	阪崎伸一郎	栄研化学株式会社
技術担当者	田野倉　修	株式会社テイエフビー
技術担当者	島名　春幸	協和メデックス株式会社
技術担当者	誉田　大仁	三洋化成工業株式会社
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	牧 浩司	東ソー株式会社
技術担当者	藤井　淳一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	林　司	株式会社カイノス
技術担当者	葉山 優	富士レビオ株式会社
技術担当者の交代について　以下の技術担当者が第 16 回会合より交代		
前任技術担当者	菊池　孝志	ロシュダイアグノスティックス株式会社
後任技術担当者	下川洋太郎	ロシュダイアグノスティックス株式会社

	氏名	所属
前任技術担当者	月本 あつ子	ベックマン・コールター株式会社
後任技術担当者	西村　和子	ベックマン・コールター株式会社

３．委員会の開催

① 第 13 回会合：2007/05/28（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
② 第 14 回会合：2007/07/10（火）12：30～14：30　（KSP ホテル　会議室）
③ 第 15 回会合：2007/09/18（火）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
④ 第 16 回会合：2007/11/08（木）15：00～17：00　（T-CAT 箱崎　会議室）
⑤ 第 17 回会合：2008/02/22（金）10：00～12：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１実験計画書

平成 19 年５月 28 日会合にて，H19 年度活動内容について協議・策定した。共同実験として，常用血清標準物質として濃度範囲を決め複数濃度のプール血清をつくり、複数のトレーサブルのキットで濃度を決定し，校正する。実験のプロトコル、患者プール（５本）は筑波大で準備する。プール血清の安定性について，冷蔵採取した検体を凍結し、安定性試験として調整時、1 週間、一ヶ月、二ヶ月位の測定値を確認する。参加試薬は９社９試薬（A- I）で，測定方法の内訳は、RIA 法１試薬、EIA 法２試薬、CLIA 法１試薬、CLEIA 法４試薬、ECLIA 法１試薬である。

参加試薬

キット名	メーカー名
アクセス　インスリン	ベックマン・コールター（株）
エクルーシス　インスリン	ロシュ・ダイアグノスティックス（株）
ケミルミ　インスリン	協和メデックス（株）
クオルタスシリーズ INSULIN 試薬	（株）カイノス
スフィアライト　インシュリン［Ⅱ］	三洋化成工業（株）
ルミパルス インシュリン-N	富士レビオ（株）
ルミパルスプレスト インシュリン	富士レビオ（株）
インシュリン‘栄研’	栄研化学（株）
ST-E ﾃｽﾄ「TOSOH」Ⅱ（IRI）	東ソー（株）

（RIA 法１試薬、EIA 法２試薬、CLIA 法１試薬、CLEIA 法４試薬、ECLIA 法１試）

４-２共同実験

４-２-１測定試料

インスリン測定には、筑波大にてプール血清を準備し、実試料標準物質の候補とした。また、試料の調製は HECTEF SRC に委託した。

	試料	数量
1	実試料標準物質候補品（患者プール血清）	５サンプル
2	健常者血清	２２サンプル

４‐２‐２測定方法

校正は各社の所定の方法で実施し、４‐２‐１ の測定試料を検体として各々２重測定し，各平均値（「報告値」）を用い結果の解析を行った（別紙 1-1・1-2)。

患者プール血清の安定性については，３社４試薬を用いて各社校正に基づき２重測定を実施した。５濃度の試料を到着時，１週，１ヶ月，２ヶ月後の４回測定し，その平均値について，初回測定値を 100%とし，経時的変動を調べた。

４‐２‐３測定結果

実試料標準候補品試料（患者プール血清）の濃度を全キットの報告値平均から求めた。

相関確認用血清（実試料標準候補品試料、健常者血清）における各試薬の相関性（X 軸：全試薬平均、Y 軸：各試薬の報告値）は相関係数 0.99～1.00、傾き 0.66～1.15 であった。

試薬 I のみが他キットと比較して報告値が低値傾向であったため、試薬 I を除外した場合の相関性は相関係数 0.99～1.00、傾き 0.93～1.15 であり血清値ではほぼ良好な相関性が　あり、第１回および第２回の共同研究結果が再現された。

第１回および第２回の共同研究結果から，WHO(NIBSC66/304)、患者プール血清いずれにおいても校正可能な５試薬より、実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる２試薬（試薬 D・試薬 F および試薬 D・F 平均値）を用い、各試薬の校正を実施した結果、低濃度域では CV 値は大きくなるが、それ以外では 10 %以内であり、収束性が認められ、有効性が示唆された。

また、２試薬および２試薬平均における収束結果の優位性は認められず、良好な結果であり、常用標準物質としての校正効果の有効性が確認できた。

①試薬 D による校正結果　（別紙 2-1・2-2・2-3）

相関確認用血清（実試料標準候補品試料、健常者血清）における各試薬（試薬 I 含）の相関性（X 軸：全試薬平均、Y 軸：各試薬の報告値）は相関係数 0.99～1.00、傾き 0.90～1.16 であった。

②試薬 F による校正結果　　（別紙 3-1・3-3・3-3）

相関確認用血清（実試料標準候補品試料、健常者血清）における各試薬（試薬 I 含）の相関性（X 軸：全試薬平均、Y 軸：各試薬の報告値）は相関係数 0.98～1.00、傾き 0.96～1.15 であった。

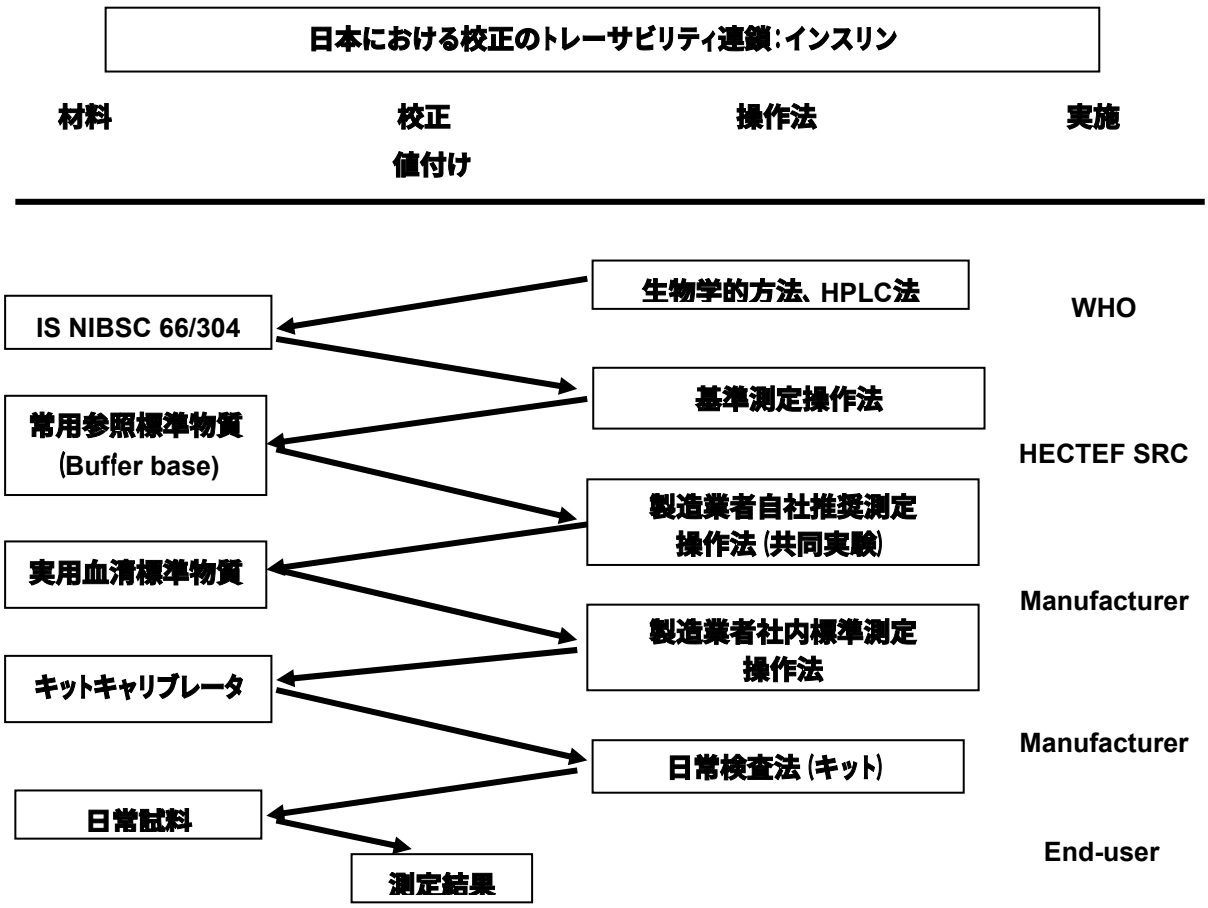
③試薬 D・試薬 F の平均値による校正結果　　（別紙 4-1・4-2）

相関確認用血清（実試料標準候補品試料、健常者血清）における各試薬（試薬 I 含）の相関性（X 軸：全試薬平均、Y 軸：各試薬の報告値）は相関係数 0.99～1.00、傾き 0.93～1.12 であった。

５．実試料標準物質の作製プロトコル

5-1 トレーサビリティ連鎖

WHO(NIBSC 66/304)を最上位に位置付ける体系とした。しかし、今回の共同実験の結果でWHO(NIBSC 66/304)や市販純物質を用いた実試料標準物質では測定値の収束性を得る事が困難であった事から、校正効果が認められたプール血清を下位の標準物質とし、共同実験によりその値付けを行う体系とした。



5-2 試料の性状規格

今後、設定する。

5-3 値付けの方法

WHO(NIBSC 66/304)から直接値付け可能な試薬を共同実験により選択し、その試薬の平均値を実試料標準物質の認証値とする。

6．今後の課題

常用標準物質として、性状規格、基準測定操作法、値付けの手順、認証値と不確かさ等も含めて実試料系標準物質の作成プロトコルを完成でき、応用が期待される。

７．結び

平成 19 年度の作業において、実試料標準物質を試作し、データの収束性が確認することができた。インスリン標準化のための常用標準物質として、その有用性が実証できた。

各試薬報告値　（実測値）

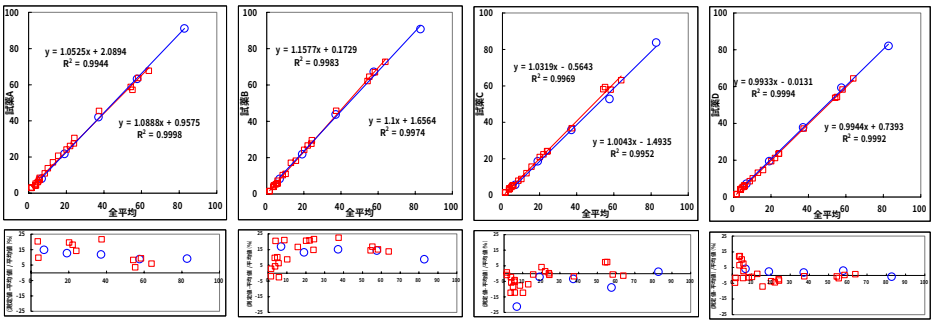
インスリン共同実験　各試薬測定結果 [平均値]　　**別紙1-1**

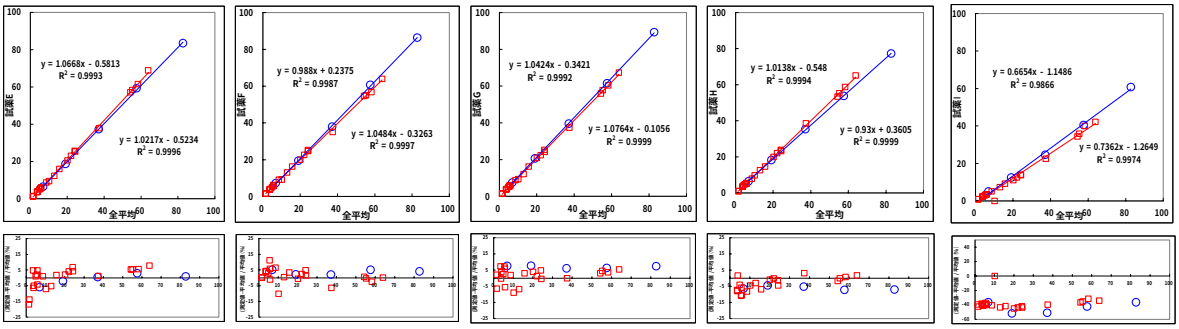
No.	ID	試料名	試薬A 報告値	試薬B 報告値	試薬C 報告値	試薬D 報告値	試薬E 報告値	試薬F 報告値	試薬G 報告値	試薬H 報告値	試薬I 報告値	平均	CV	Min.	Max.
1	IN-1	インスリン･C-ペプチド:患者プール血清1	8.1	8.30	5.69	7.2	6.51	7.27	7.46	6.48	5.07	6.90	21.0	5.07	8.30
2	IN-2	インスリン･C-ペプチド:患者プール血清2	21.8	21.93	18.63	19.5	18.64	19.45	20.62	18.22	12.55	19.04	22.2	12.55	21.93
3	IN-3	インスリン･C-ペプチド:患者プール血清3	42.1	43.76	35.89	37.8	37.29	37.90	39.51	35.28	24.62	37.13	22.1	24.62	43.76
4	IN-4	インスリン･C-ペプチド:患者プール血清4	63.2	67.28	52.87	59.4	59.32	60.70	61.52	53.73	40.50	57.61	19.2	40.50	67.28
5	IN-5	インスリン･C-ペプチド:患者プール血清5	91.1	90.81	83.77	82.1	83.48	86.34	89.35	77.30	60.72	82.77	15.5	60.72	91.10
11	1-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前1ー1	4.3	4.72	3.69	4.40	3.72	4.07	4.07	3.98	2.32	3.92	29.4	2.32	4.72
12	2-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前2ー1	3.2	1.67	1.61	1.60	1.40	1.63	1.52	1.06	0.94	1.63	68.7	0.94	3.20
13	3-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前3ー1	5.3	3.92	3.67	4.00	3.52	3.92	3.75	3.46	2.29	3.76	33.8	2.29	5.30
14	4-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前4ー1	6.2	5.40	4.49	5.40	4.95	5.05	5.03	4.70	2.92	4.90	30.5	2.92	6.20
15	5-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前5ー1	2.9	1.44	1.48	1.40	1.22	1.47	1.50	0.92	0.89	1.47	65.9	0.89	2.90
16	6-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前6ー1	7.2	5.95	5.30	5.50	5.71	6.22	6.00	5.00	3.51	5.60	28.6	3.51	7.20
17	7-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前7ー1	4.3	3.92	3.13	4.00	3.74	3.72	3.83	3.31	2.20	3.57	28.3	2.20	4.30
18	8-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前8ー1	7.4	5.62	5.53	6.20	6.04	6.10	6.10	5.43	3.52	5.77	29.1	3.52	7.40
19	9-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前9ー1	13.8	11.09	8.93	10.10	9.47	9.16	9.28	9.74	-	10.20	16.5	8.93	13.80
20	10-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前10ー1	8.5	7.30	5.12	6.00	5.59	5.77	5.51	5.21	3.53	5.84	39.6	3.53	8.50
21	11-1	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食前11ー1	11.0	10.42	7.95	8.50	8.69	9.17	8.78	7.90	5.13	8.62	32.6	5.13	11.00
31	1-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後1ー2	57.2	64.57	59.35	54.30	58.29	55.07	57.73	55.22	35.83	55.28	22.1	35.83	64.57
32	2-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後2ー2	24.1	24.31	20.97	19.40	20.56	20.04	20.93	19.95	11.08	20.15	34.5	11.08	24.31
33	3-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後3ー2	26.1	26.68	22.40	21.10	22.98	22.62	22.35	22.04	12.49	22.08	32.5	12.49	26.68
34	4-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後4ー2	63.7	67.07	57.90	58.40	61.51	56.77	60.35	58.69	40.03	58.27	18.9	40.03	67.07
35	5-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後5ー2	27.5	27.64	24.14	23.50	25.70	25.26	25.23	23.79	14.00	24.08	29.0	14.00	27.64
36	6-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後6ー2	20.7	18.34	15.62	14.60	16.00	16.24	16.19	14.64	9.17	15.72	34.0	9.17	20.70
37	7-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後7ー2	67.7	72.76	63.08	64.40	68.92	63.98	67.31	65.04	42.13	63.92	20.7	42.13	72.76
38	8-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後8ー2	58.8	62.16	58.26	53.90	57.15	54.64	55.91	53.37	34.44	54.29	23.0	34.44	62.16
39	9-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後9ー2	45.5	45.83	36.72	37.20	37.83	35.03	37.38	38.56	22.55	37.40	29.9	22.55	45.83
40	10-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後10ー2	17.1	17.14	12.07	13.10	12.29	13.03	12.09	12.58	7.32	12.97	40.0	7.32	17.14
41	11-2	インスリン･C-ペプチド:健常人血清食後11ー2	30.5	29.57	24.09	23.50	25.33	24.67	24.18	23.21	13.70	24.31	34.8	13.70	30.50

各試薬（全平均）に対する校正値

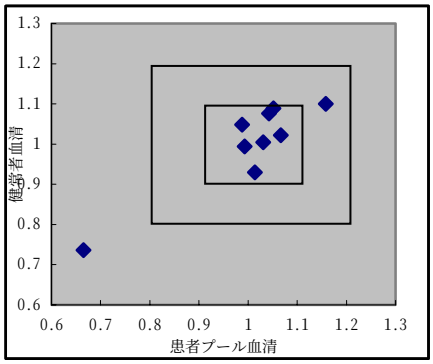
各試薬資料測定結果

測定値 (X軸:測定値平均　Y軸:各測定値)　　**別紙1-2**





目標値に対する傾きの分布



目標値（試薬 D）に対する校正値

・標準品および純品からの傾き、切片を 換算係数として血清検体を換算 (換算値＝ (血清測定値-Intercept) /Slope)

標準法を試薬Dにした場合　　**別紙2-1**

No.	試料名	濃度	標準測定法(仮) 試薬D	試薬A	試薬B	試薬C	試薬D	試薬E	試薬F	試薬G	試薬H	試薬I	平均	CV	Min.	Max.
			濃度	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値				
1	IN-1	インスリン:患者プール血清1	7.2	8.10	8.30	5.69	7.2	6.51	7.27	7.46	6.48	5.07	6.90	15.4	5.07	8.30
2	IN-2	インスリン:患者プール血清2	19.5	21.80	21.93	18.63	19.5	18.64	19.45	20.62	18.22	12.55	19.04	14.6	12.55	21.93
3	IN-3	インスリン:患者プール血清3	37.8	42.10	43.76	35.89	37.8	37.29	37.90	39.51	35.28	24.62	37.13	14.7	24.62	43.76
4	IN-4	インスリン:患者プール血清4	59.4	63.20	67.28	52.87	59.4	59.32	60.70	61.52	53.73	40.50	57.61	13.5	40.50	67.28
5	IN-5	インスリン:患者プール血清5	82.1	91.10	90.81	83.77	82.1	83.48	86.34	89.35	77.30	60.72	82.77	11.4	60.72	91.10
		Slope		1.09	1.11	1.01	1.00	1.03	1.05	1.08	0.93	0.74				
		Intercept		0.19	0.81	-2.13	0.00	-1.27	-1.08	-0.86	-0.30	-1.76				
		Correl		0.9994	0.9997	0.9953	1.0000	0.9999	0.9997	0.9993	0.9995	0.9973				

換算

	インスリン:患者プール血清1	7.2	7.23	6.76	7.76	7.20	7.57	7.92	7.69	7.25	9.24	7.63	9.2	6.76	9.24
	インスリン:患者プール血清2	19.5	19.75	19.08	20.61	19.50	19.38	19.48	19.86	19.82	19.36	19.65	2.2	19.08	20.61
	インスリン:患者プール血清3	37.8	38.31	38.80	37.74	37.80	37.54	36.99	37.33	38.07	35.69	37.59	2.4	35.69	38.80
	インスリン:患者プール血清4	59.4	57.60	60.05	54.60	59.40	58.99	58.63	57.69	57.82	57.18	58.00	2.7	54.60	60.05
	インスリン:患者プール血清5	82.1	83.10	81.31	85.28	82.10	82.51	82.97	83.42	83.04	84.53	83.14	1.4	81.31	85.28

No.	試料名	濃度	濃度	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	平均	CV	Min.	Max.
11	1-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前1ー1	4.40	3.76	3.53	5.77	4.40	4.86	4.89	4.56	4.58	5.52	4.65	15.7	3.53	5.77
12	2-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前2ー1	1.60	2.75	0.77	3.71	1.60	2.60	2.57	2.20	1.45	3.65	2.37	41.4	0.77	3.71
13	3-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前3ー1	4.00	4.67	2.81	5.75	4.00	4.66	4.74	4.26	4.02	5.48	4.49	19.4	2.81	5.75
14	4-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前4ー1	5.40	5.49	4.14	6.57	5.40	6.06	5.82	5.45	5.35	6.33	5.62	12.5	4.14	6.57
15	5-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前5ー1	1.40	2.48	0.57	3.58	1.40	2.42	2.42	2.18	1.30	3.58	2.21	45.4	0.57	3.58
16	6-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前6ー1	5.50	6.41	4.64	7.37	5.50	6.80	6.93	6.34	5.67	7.13	6.31	14.0	4.64	7.37
17	7-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前7ー1	4.00	3.76	2.81	5.22	4.00	4.88	4.55	4.34	3.86	5.36	4.31	18.7	2.81	5.36
18	8-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前8ー1	6.20	6.59	4.34	7.60	6.20	7.12	6.81	6.43	6.13	7.14	6.49	14.4	4.34	7.60
19	9-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前9ー1	10.10	12.44	9.28	10.98	10.10	10.46	9.72	9.38	10.74	-	10.39	9.9	9.28	12.44
20	10-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前10ー1	6.00	7.60	5.86	7.19	6.00	6.68	6.50	5.89	5.89	7.16	6.53	10.2	5.86	7.60
21	11-1	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食前11ー1	8.50	9.88	8.68	10.00	8.50	9.70	9.73	8.91	8.77	9.32	9.28	6.2	8.50	10.00
31	1-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後1ー2	54.30	52.11	57.60	61.04	54.30	57.99	53.29	54.18	59.41	50.86	55.64	6.3	50.86	61.04
32	2-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後2ー2	19.40	21.86	21.23	22.93	19.40	21.25	20.04	20.15	21.67	17.37	20.66	7.9	17.37	22.93
33	3-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後3ー2	21.10	23.69	23.37	24.35	21.10	23.61	22.49	21.46	23.90	19.28	22.58	7.4	19.28	24.35
34	4-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後4ー2	58.40	58.06	59.86	59.60	58.40	61.12	54.90	56.61	63.12	56.54	58.69	4.3	54.90	63.12
35	5-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後5ー2	23.50	24.96	24.24	26.08	23.50	26.26	25.00	24.13	25.78	21.32	24.58	6.3	21.32	26.26
36	6-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後6ー2	14.60	18.75	15.83	17.62	14.60	16.81	16.44	15.77	15.99	14.79	16.29	8.1	14.60	18.75
37	7-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後7ー2	64.40	61.71	65.00	64.74	64.40	68.34	61.75	63.04	69.92	59.38	64.25	5.1	59.38	69.92
38	8-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後8ー2	53.90	53.58	55.42	59.96	53.90	56.88	52.88	52.50	57.43	48.98	54.61	5.9	48.98	59.96
39	9-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後9ー2	37.20	41.42	40.67	38.57	37.20	38.07	34.27	35.36	41.58	32.89	37.78	8.3	32.89	41.58
40	10-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後10ー2	13.10	15.46	14.75	14.09	13.10	13.20	13.39	11.97	13.78	12.28	13.56	8.2	11.97	15.46
41	11-2	インスリン:C-ペプチド:健常人血清食後11ー2	23.50	27.71	25.98	26.03	23.50	25.90	24.44	23.16	25.16	20.92	24.75	8.1	20.92	27.71

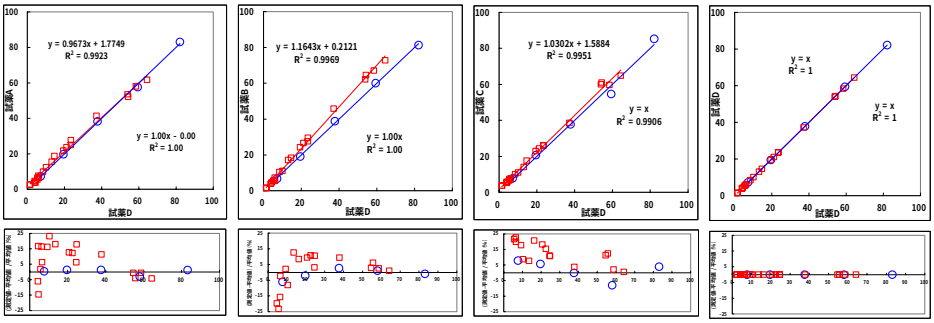
別紙2-2

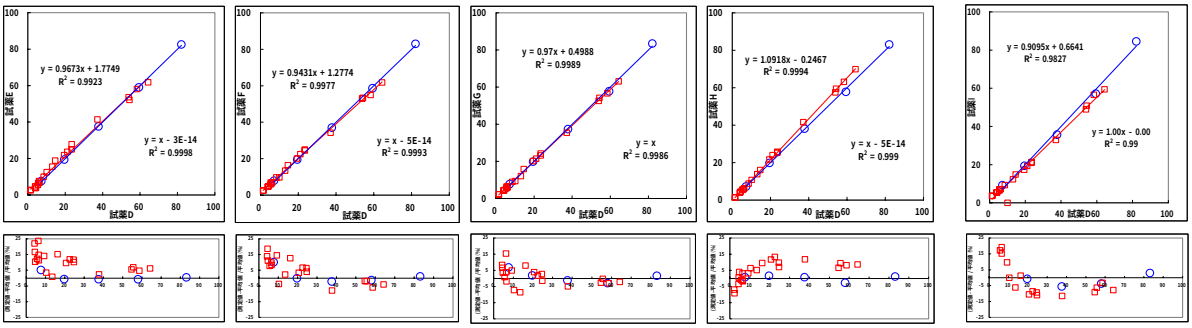
インスリン　各社キットの　換算
標準法を試薬Dにした場合
機体相関

	Y	試薬A	試薬B	試薬C	試薬D	試薬E	試薬F	試薬G	試薬H	試薬I	Mean
試薬A	Slope		1.08	1.06	1.03	1.07	0.97	0.99	1.12	0.92	1.05
	Intercept		-2.38	-0.13	-1.67	-1.04	-0.30	-1.11	-2.09	0.01	-1.25
	Correl		0.9983	0.9939	0.9961	0.9955	0.9955	0.9952	0.9968	0.9916	1.00
試薬B	Slope	0.92		0.98	0.95	0.99	0.89	0.92	1.04	0.85	0.96
	Intercept	2.26		2.15	0.58	1.30	1.81	1.06	0.37	1.88	1.36
	Correl	0.9983		0.9974	0.9984	0.9980	0.9980	0.9980	0.9990	0.9948	1.00
試薬C	Slope	0.93	1.02		0.97	1.01	0.91	0.94	1.05	0.87	0.98
	Intercept	0.38	-2.09		-1.44	-0.83	-0.12	-0.92	-1.82	0.04	-0.98
	Correl	0.9939	0.9974		0.9976	0.9981	0.9985	0.9983	0.9974	0.9952	1.00
試薬D	Slope	0.97	1.05	1.03		1.05	0.94	0.97	1.09	0.90	1.01
	Intercept	1.77	-0.54	1.59		0.69	1.28	0.50	-0.25	1.38	0.72
	Correl	0.9961	0.9984	0.9976		0.9995	0.9988	0.9995	0.9997	0.9983	1.00
試薬E	Slope	0.92	1.01	0.99	0.96		0.90	0.93	1.04	0.86	0.96
	Intercept	1.16	-1.22	0.90	-0.64		0.65	-0.14	-0.95	0.75	-0.04
	Correl	0.9955	0.9980	0.9981	0.9995		0.9996	0.9999	0.9993	0.9979	1.00
試薬F	Slope	1.02	1.11	1.09	1.06	1.11		1.03	1.16	0.95	1.08
	Intercept	0.50	-1.93	0.20	-1.30	-0.70		-0.79	-1.67	0.14	-0.81
	Correl	0.9955	0.9980	0.9985	0.9988	0.9996		0.9995	0.9986	0.9965	1.00
試薬G	Slope	1.00	1.08	1.06	1.03	1.08	0.97		1.12	0.93	1.05
	Intercept	1.31	-1.06	1.05	-0.49	0.16	0.79		-0.79	0.87	0.14
	Correl	0.9952	0.9980	0.9983	0.9995	0.9999	0.9995		0.9994	0.9980	1.00
試薬H	Slope	0.89	0.96	0.94	0.92	0.96	0.86	0.89		0.82	0.92
	Intercept	1.99	-0.31	1.83	0.24	0.94	1.50	0.72		1.60	0.99
	Correl	0.9968	0.9990	0.9974	0.9997	0.9993	0.9986	0.9994		0.9975	1.00
試薬I	Slope	1.07	1.16	1.14	1.11	1.16	1.05	1.08	1.21		1.12
	Intercept	0.36	-1.98	0.17	-1.46	-0.78	-0.01	-0.86	-1.83		-0.80
	Correl	0.9916	0.9948	0.9952	0.9983	0.9979	0.9965	0.9980	0.9975		1.00

測定値 (X軸：試薬D　Y軸：各測定値)
試薬Dプール血清値基準

別紙2-3





目標値（試薬 F）に対する校正値

・標準品および純品からの傾き、切片を 換算係数として血清検体を換算 (換算値＝ (血清測定値-Intercept) / Slope)

標準法を試薬Fにした場合

別紙３-１

No.	試料名	濃度	標準測定法（仮）試薬 報告値	試薬A 報告値	試薬B 報告値	試薬C 報告値	試薬D 報告値	試薬E 報告値	試薬F 報告値	試薬G 報告値	試薬H 報告値	試薬I 報告値	平均	CV	Min.	Max.
1	IN-1	インスリン：患者プール血清1	7.27	8.10	8.30	5.69	7.2	6.51	7.27	7.46	6.48	5.07	6.90	12.6	5.69	8.30
2	IN-2	インスリン：患者プール血清2	19.45	21.80	21.93	18.63	19.5	18.64	19.45	20.62	18.22	12.55	19.85	7.3	18.22	21.93
3	IN-3	インスリン：患者プール血清3	37.90	42.10	43.76	35.89	37.8	37.29	37.90	39.51	35.28	24.62	38.69	7.6	35.28	43.76
4	IN-4	インスリン：患者プール血清4	60.70	63.20	67.28	52.87	59.4	59.32	60.70	61.52	53.73	40.50	59.75	7.9	52.87	67.28
5	IN-5	インスリン：患者プール血清5	86.34	91.10	90.81	83.77	82.1	83.48	86.34	89.35	77.30	60.72	85.53	5.6	77.30	91.10
		Slope		1.04	1.05	0.96	0.95	0.97	1.00	1.03	0.89	0.70				
		Intercept		1.32	2.00	-1.14	1.05	-0.20	0.00	0.24	0.67	-1.04				
		Correl		0.9995	0.9987	0.9968	0.9997	0.9999	1.0000	0.9998	0.9997	0.9989				

換算

		インスリン：患者プール血清1	7.27	6.53	6.00	7.14	6.48	6.89	7.27	7.03	6.56	8.70	6.74	6.2	6.00	7.27
		インスリン：患者プール血清2	19.45	19.73	18.99	20.66	19.45	19.34	19.45	19.85	19.80	19.35	19.66	2.5	18.99	20.66
		インスリン：患者プール血清3	37.90	39.29	39.80	38.70	38.75	38.48	37.90	38.26	39.04	36.53	38.78	1.5	37.90	39.80
		インスリン：患者プール血清4	60.70	59.61	62.22	56.44	61.52	61.08	60.70	59.70	59.84	59.15	60.14	2.9	56.44	62.22
		インスリン：患者プール血清5	86.34	86.49	84.65	88.73	85.46	85.88	86.34	86.81	86.42	87.94	86.35	1.4	84.65	88.73

No.	試料名	濃度	濃度	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	平均	CV	Min.	Max.
11	1-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前1ー1	4.07	2.87	2.59	5.05	3.53	4.03	4.07	3.73	3.74	4.78	3.70	20.5	2.59	5.05
12	2-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前2ー1	1.63	1.81	-0.32	2.88	0.58	1.65	1.63	1.25	0.45	2.82	1.24	79.7	-0.32	2.88
13	3-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前3ー1	3.92	3.84	1.83	5.03	3.11	3.82	3.92	3.42	3.15	4.74	3.51	25.9	1.83	5.03
14	4-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前4ー1	5.05	4.70	3.24	5.89	4.59	5.29	5.05	4.67	4.55	5.64	4.75	16.0	3.24	5.89
15	5-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前5ー1	1.47	1.52	-0.54	2.74	0.37	1.46	1.47	1.23	0.29	2.75	1.07	93.9	-0.54	2.74
16	6-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前6ー1	6.22	5.67	3.76	6.73	4.69	6.07	6.22	5.61	4.89	6.48	5.45	17.6	3.76	6.73
17	7-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前7ー1	3.72	2.87	1.83	4.47	3.11	4.05	3.72	3.50	2.98	4.61	3.31	24.5	1.83	4.47
18	8-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前8ー1	6.10	5.86	3.45	6.97	5.43	6.41	6.10	5.71	5.37	6.49	5.66	18.3	3.45	6.97
19	9-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前9ー1	9.16	12.02	8.66	10.53	9.54	9.93	9.16	8.81	10.23	-	9.86	11.1	8.66	12.02
20	10-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前10ー1	5.77	6.92	5.05	6.54	5.22	5.94	5.77	5.13	5.13	6.50	5.71	12.5	5.05	6.92
21	11-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前11ー1	9.17	9.33	8.02	9.50	7.85	9.13	9.17	8.32	8.16	8.78	8.68	7.6	7.85	9.50
31	1-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後1ー2	55.07	53.83	59.64	63.21	56.14	60.03	55.07	56.01	61.52	52.50	58.18	5.8	53.83	63.21
32	2-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後2ー2	20.04	21.95	21.26	23.11	19.35	21.31	20.04	20.16	21.75	17.25	21.11	5.8	19.35	23.11
33	3-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後3ー2	22.62	23.87	23.52	24.60	21.14	23.79	22.62	21.54	24.11	19.26	23.15	5.4	21.14	24.60
34	4-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後4ー2	56.77	60.10	62.02	61.69	60.47	63.33	56.77	58.56	65.44	58.48	61.05	4.4	56.77	65.44
35	5-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後5ー2	25.26	25.22	24.43	26.42	23.67	26.58	25.26	24.35	26.08	21.41	25.25	4.2	23.67	26.58
36	6-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後6ー2	16.24	18.67	15.57	17.52	14.29	16.63	16.24	15.54	15.76	14.54	16.28	8.3	14.29	18.67
37	7-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後7ー2	63.98	63.95	67.44	67.11	66.79	70.93	63.98	65.34	72.60	61.47	67.27	4.6	63.95	72.60
38	8-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後8ー2	54.64	55.38	57.34	62.07	55.72	58.86	54.64	54.24	59.44	50.52	57.21	4.8	54.24	62.07
39	9-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後9ー2	35.50	42.56	41.77	39.56	38.11	39.03	35.03	36.18	42.74	33.59	39.37	7.3	35.03	42.74
40	10-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後10ー2	13.03	15.20	14.43	13.81	12.70	12.82	13.03	11.54	13.44	11.90	13.37	8.4	11.54	15.20
41	11-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後11ー2	24.67	28.11	26.27	26.37	23.67	26.20	24.67	23.32	25.42	20.99	25.51	6.2	23.32	28.11

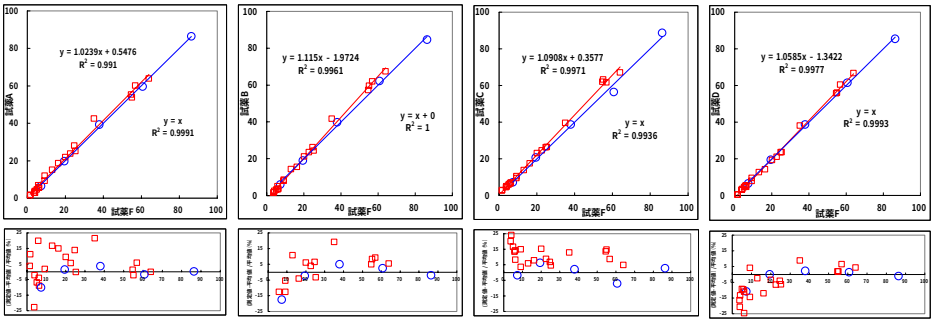
別紙3-2

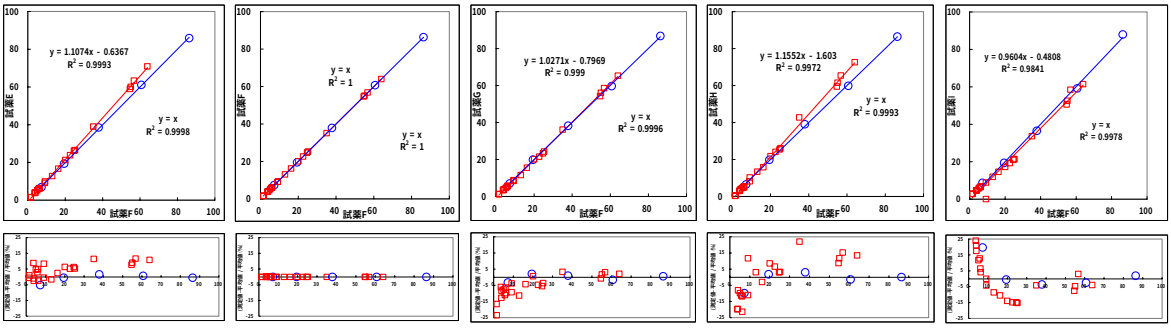
インスリン 各社キットの 換算
標準法を試薬Fにした場合
検体相関

	Y	試薬A	試薬B	試薬C	試薬D	試薬E	試薬F	試薬G	試薬H	試薬I	Mean
試薬A	Slope		1.08	1.06	1.03	1.07	0.97	0.99	1.12	0.92	1.05
	Intercept		-2.47	-0.02	-1.75	-1.03	-0.35	-1.16	-2.07	-0.02	-1.26
	Correl		0.9983	0.9939	0.9961	0.9955	0.9955	0.9952	0.9968	0.9916	1.00
試薬B	Slope	0.92		0.98	0.95	0.99	0.89	0.92	1.03	0.85	0.95
	Intercept	2.34		2.35	0.58	1.39	1.84	1.09	0.47	1.92	1.44
	Correl	0.9983		0.9974	0.9984	0.9980	0.9980	0.9980	0.9990	0.9948	1.00
試薬C	Slope	0.94	1.02		0.97	1.01	0.91	0.94	1.06	0.87	0.98
	Intercept	0.28	-2.29		-1.63	-0.93	-0.27	-1.08	-1.92	-0.09	-1.12
	Correl	0.9939	0.9974		0.9976	0.9981	0.9985	0.9983	0.9974	0.9952	1.00
試薬D	Slope	0.97	1.05	1.03		1.04	0.94	0.97	1.09	0.90	1.01
	Intercept	1.86	-0.54	1.78		0.79	1.31	0.53	-0.14	1.42	0.80
	Correl	0.9961	0.9984	0.9976		0.9995	0.9988	0.9995	0.9997	0.9983	1.00
試薬E	Slope	0.92	1.01	0.98	0.96		0.90	0.93	1.04	0.86	0.96
	Intercept	1.14	-1.32	1.00	-0.74		0.59	-0.21	-0.95	0.70	-0.07
	Correl	0.9955	0.9980	0.9981	0.9995		0.9996	0.9999	0.9993	0.9979	1.00
試薬F	Slope	1.02	1.11	1.09	1.06	1.11		1.03	1.16	0.95	1.08
	Intercept	0.55	-1.97	0.36	-1.34	-0.64		-0.80	-1.60	0.15	-0.78
	Correl	0.9955	0.9980	0.9985	0.9988	0.9996		0.9995	0.9986	0.9965	1.00
試薬G	Slope	1.00	1.08	1.06	1.03	1.08	0.97		1.13	0.92	1.05
	Intercept	1.36	-1.10	1.22	-0.52	0.23	0.79		-0.71	0.88	0.18
	Correl	0.9952	0.9980	0.9983	0.9995	0.9999	0.9995		0.9994	0.9980	1.00
試薬H	Slope	0.89	0.96	0.94	0.92	0.96	0.86	0.89		0.82	0.92
	Intercept	1.97	-0.42	1.92	0.14	0.93	1.44	0.66		1.55	0.95
	Correl	0.9968	0.9990	0.9974	0.9997	0.9993	0.9986	0.9994		0.9975	1.00
試薬I	Slope	1.07	1.17	1.14	1.11	1.16	1.05	1.08	1.21		1.12
	Intercept	0.39	-2.03	0.33	-1.51	-0.72	-0.01	-0.87	-1.77		-0.77
	Correl	0.9916	0.9948	0.9952	0.9983	0.9979	0.9965	0.9980	0.9975		1.00

測定値（X軸：試薬F　Y軸：測定値）
試薬Fプール血清値基準

別紙3-3





目標値（試薬 D・試薬 F 平均）に対する校正値

・標準品および純品からの傾き、切片を 換算係数として血清検体を換算 (換算値＝ (血清測定値 - Intercept) / Slope)

標準法を試薬Dと試薬Fの平均にした場合

別紙4-1

No.	試料名	濃度	標準測定法（仮）2社平均	試薬A 報告値	試薬B 報告値	試薬C 報告値	試薬D 報告値	試薬E 報告値	試薬F 報告値	試薬G 報告値	試薬H 報告値	試薬I 報告値	平均	CV	Min.	Max.
1	IN-1	インスリン：患者プール血清1	7.24	8.10	8.30	5.69	7.2	6.51	7.27	7.46	6.48	5.07	6.90	12.6	5.69	8.30
2	IN-2	インスリン：患者プール血清2	19.48	21.80	21.93	18.63	19.5	18.64	19.45	20.62	18.22	12.55	19.04	7.6	18.22	21.93
3	IN-3	インスリン：患者プール血清3	37.85	42.10	43.76	35.89	37.8	37.29	37.90	39.51	35.28	24.62	37.13	7.9	35.28	43.76
4	IN-4	インスリン：患者プール血清4	60.05	63.20	67.28	52.87	59.4	59.32	60.70	61.52	53.73	40.50	57.61	8.2	52.87	67.28
5	IN-5	インスリン：患者プール血清5	84.22	91.10	90.81	83.77	82.1	83.48	86.34	89.35	77.30	60.72	82.77	5.8	77.30	91.10
		Slope		1.07	1.08	0.98	0.97	1.00	1.03	1.05	0.91	0.72				
		Intercept		0.76	1.42	-1.63	0.53	-0.73	-0.53	-0.30	0.19	-1.39				
		Correl		0.9995	0.9993	0.9961	0.9999	1.0000	0.9999	0.9996	0.9997	0.9982				

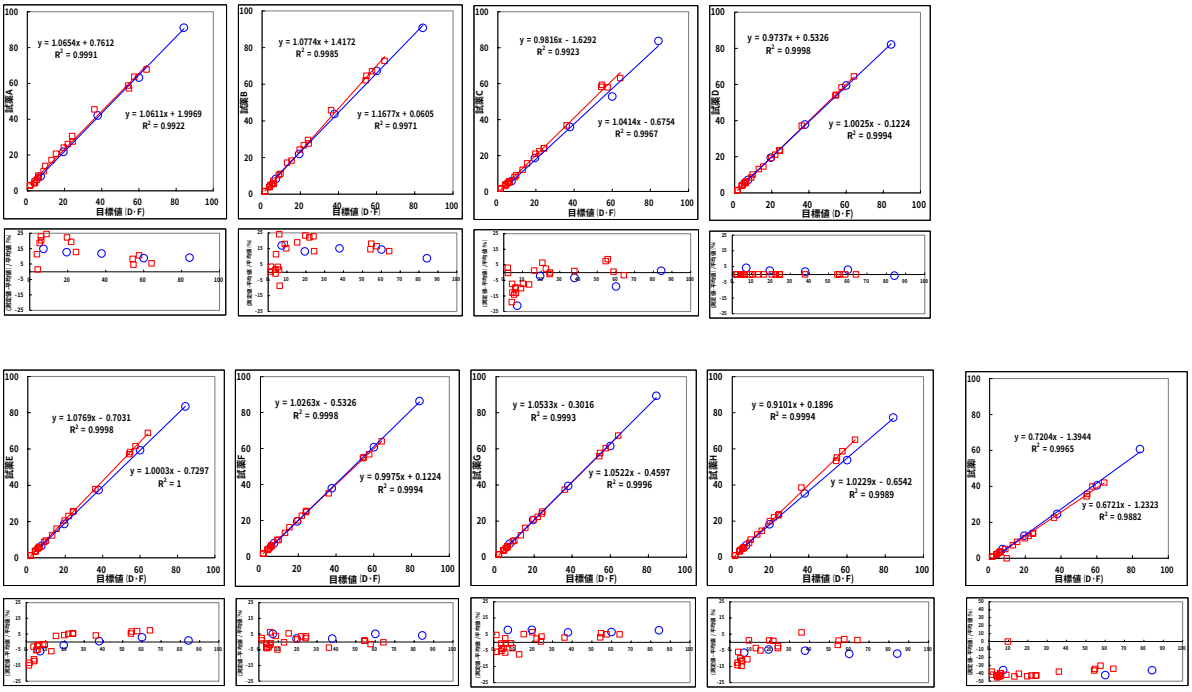
換算

		インスリン：患者プール血清1	7.24	6.89	6.39	7.46	6.85	7.24	7.60	7.37	6.91	8.97	7.30	5.5	6.39	7.60
		インスリン：患者プール血清2	19.48	19.75	19.04	20.64	19.48	19.36	19.47	19.86	19.81	19.36	19.64	2.4	19.04	20.64
		インスリン：患者プール血清3	37.85	38.80	39.30	38.22	38.27	38.01	37.45	37.80	38.56	36.11	38.06	1.5	37.45	39.30
		インスリン：患者プール血清4	60.05	58.60	61.13	55.52	60.46	60.03	59.66	58.69	58.83	58.16	59.01	2.9	55.52	61.13
		インスリン：患者プール血清5	84.22	84.79	82.97	87.00	83.77	84.19	84.65	85.11	84.72	86.23	84.83	1.4	82.97	87.00

No.	試料名	濃度	濃度	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	報告値	平均	CV	Min.	Max.
11	1-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前1ー1	4.24	3.32	3.07	5.42	3.97	4.45	4.48	4.15	4.16	5.16	4.24	17.1	3.07	5.42
12	2-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前2ー1	1.62	2.29	0.23	3.30	1.10	2.13	2.11	1.73	0.96	3.24	1.90	50.0	0.23	3.30
13	3-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前3ー1	3.96	4.26	2.32	5.40	3.56	4.25	4.34	3.85	3.59	5.11	4.08	21.5	2.32	5.40
14	4-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前4ー1	5.23	5.10	3.70	6.23	5.00	5.68	5.44	5.06	4.96	5.99	5.24	13.9	3.70	6.23
15	5-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前5ー1	1.44	2.01	0.02	3.17	0.89	1.95	1.95	1.71	0.80	3.17	1.74	55.3	0.02	3.17
16	6-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前6ー1	5.86	6.04	4.21	7.06	5.10	6.44	6.58	5.98	5.29	6.81	5.94	15.5	4.21	7.06
17	7-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前7ー1	3.86	3.32	2.32	4.85	3.56	4.47	4.14	3.92	3.43	4.99	3.89	20.1	2.32	4.85
18	8-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前8ー1	6.15	6.23	3.90	7.29	5.82	6.77	6.46	6.08	5.76	6.82	6.13	16.3	3.90	7.29
19	9-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前9ー1	9.63	12.24	8.98	10.76	9.83	10.20	9.44	9.10	10.49	-	10.13	10.5	8.98	12.24
20	10-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前10ー1	5.89	7.26	5.46	6.88	5.62	6.32	6.14	5.52	5.52	6.84	6.17	11.2	5.46	7.26
21	11-1	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食前11ー1	8.84	9.61	8.36	9.76	8.18	9.42	9.45	8.62	8.47	9.06	8.99	7.1	8.18	9.76
31	1-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後1ー2	54.69	52.97	58.62	62.12	55.22	59.00	54.18	55.09	60.46	51.67	56.59	5.8	52.97	62.12
32	2-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後2ー2	19.72	21.91	21.25	23.02	19.38	21.28	20.05	20.16	21.71	17.32	20.67	5.7	19.38	23.02
33	3-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後3ー2	21.86	23.78	23.45	24.48	21.12	23.70	22.56	21.50	24.01	19.27	22.65	5.4	21.12	24.48
34	4-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後4ー2	57.59	59.07	60.94	60.64	59.43	62.22	55.83	57.58	64.28	57.51	59.72	4.4	55.83	64.28
35	5-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後5ー2	24.38	25.10	24.34	26.25	23.59	26.42	25.13	24.24	25.93	21.37	24.71	4.2	23.59	26.42
36	6-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後6ー2	15.42	18.71	15.71	17.57	14.45	16.73	16.34	15.66	15.88	14.67	16.19	8.1	14.45	18.71
37	7-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後7ー2	64.19	62.83	66.22	65.92	65.59	69.63	62.86	64.19	71.25	60.42	65.43	4.6	62.83	71.25
38	8-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後8ー2	54.27	54.47	56.38	61.01	54.81	57.86	53.76	53.37	58.43	49.75	55.54	4.8	53.37	61.01
39	9-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後9ー2	36.35	41.99	41.22	39.07	37.66	38.55	34.65	35.77	42.16	33.24	38.26	7.3	34.65	42.16
40	10-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後10ー2	13.07	15.34	14.59	13.96	12.91	13.02	13.22	11.76	13.61	12.10	13.39	8.2	11.76	15.34
41	11-2	インスリン･C-ペプチド：健常人血清食後11ー2	24.09	27.91	26.13	26.20	23.59	26.05	24.56	23.24	25.29	20.95	24.88	6.2	23.24	27.91

補正前

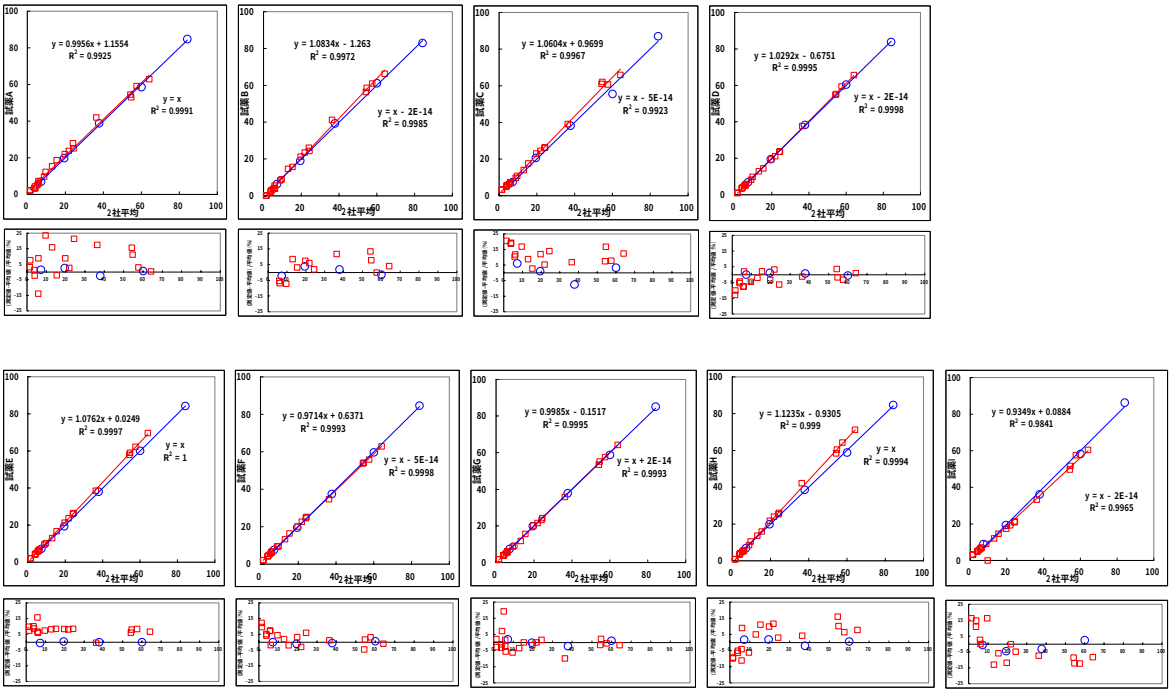
測定値（X軸：試薬D・F目標値　Y軸：各測定値）
目標値基準(試薬D・F平均)



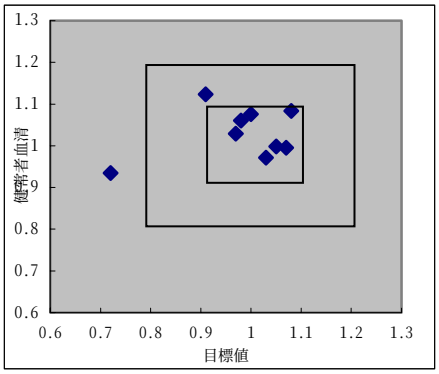
補正後

測定値（X軸：試薬D・試薬F平均　Y軸：各測定値）
2社平均プール血清値基準

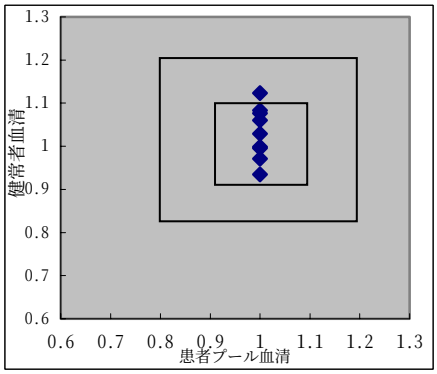
別紙4-2



２試薬較正値（健常者血清の傾きの分布）



較正後　目標値に対する傾きの分布



2-2-3-6　C-ペプチド

要旨

1）血清中の C-ペプチド測定について、平成 18 年度の共同実験にて、実試料系標準物質がデータの収束性に有効性であることが示唆された。

2）実試料標準物質候補品での収束性を再確認する目的で、標準物質候補品として患者プール血清試料を作製し、あわせて健常人血清を測定した。

3）現在の市販試薬では血清値は収束していることが再確認された。

4）実試料標準物質としてトレーサビリティが認められる５試薬を用い、各試薬の校正を実施した結果、前回同様の収束性が確認された。

5）試作した実試料標準物質が常用標準物質としてその有用性が実証できた。

１．目的

C-ペプチド標準化のため実試料系標準物質のプロトタイプを作製する。併せて実試料系標準物質候補品での測定値収束性の再確認をした後に、性状規格、基準測定操作法、値付けの手順、認証値と不確かさ等も含めて実試料系標準物質の作製プロトコルを完成させる。

２．委員会の構成

	氏名	所属
責任者/アドバイザー	桑　　克彦	筑波大学大学院人間総合科学研究科
運営管理者（臨薬協）	望月　克彦	富士レビオ株式会社
柱 1／J2 担当	藤橋　和夫	日本臨床検査標準協議会
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	阪崎伸一郎	栄研化学株式会社
技術担当者	田野倉　修	株式会社テイエフビー
技術担当者	島名　春幸	協和メデックス株式会社
技術担当者	誉田　大仁	三洋化成工業株式会社
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	牧 浩司	東ソー株式会社
技術担当者	藤井　淳一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	林　司	株式会社カイノス
技術担当者	葉山 優	富士レビオ株式会社
技術担当者の交代について　以下の技術担当者が第 16 回会合より交代		
前任技術担当者	菊池　孝志	ロシュダイアグノスティックス株式会社
後任技術担当者	下川洋太郎	ロシュダイアグノスティックス株式会社
前任技術担当者	月本 あつ子	ベックマン・コールター株式会社

	氏名	所属
後任技術担当者	西村　和子	ベックマン・コールター株式会社

３．委員会の開催

⑥ 第 13 回会合：2007/05/28（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑦ 第 14 回会合：2007/07/10（火）12：30～14：30　（KSP　704 会議室）
⑧ 第 15 回会合：2007/09/18（火）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑨ 第 16 回会合：2007/11/08（木）15：00～17：00　（T-CAT 箱崎　会議室）
⑩ 第 17 回会合：2008/02/22（金）10：00～12：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１ 実験計画書

平成 19 年５月 28 日会合にて，H19 年度活動内容について協議・策定した。共同実験として，常用血清標準物質として濃度範囲を決め複数濃度のプール血清をつくり、複数のトレーサブルのキットで濃度を決定し，校正する。実験のプロトコール、患者プール（５本）は筑波大で準備する。プール血清の安定性について，冷蔵採取した検体を凍結し、安定性試験として調整時、1 週間、一ヶ月、二ヶ月位の測定値を確認する。参加試薬は７社８試薬（C- J）で，測定方法の内訳は、RIA 法１試薬、EIA 法２試薬、CLIA 法２試薬、CLEIA 法２試薬、ECLIA 法１試薬である。

表１　共同実験参加試薬名および企業

試薬名	企業名
Ｃ-ペプチドキット「第一」Ⅲ	（株）テイエフビー
Ｅテスト「ＴＯＳＯＨ」Ⅱ(Ｃ-ペプチド)	東ソー（株）
エクルーシス試薬Ｃ-ペプチド	ロシュ・ダイアグノスティックス（株）
クオルタスシリーズＣ-ペプチド試薬	（株）カイノス
ケミルミＣ-ペプタイド	協和メデックス（株）
スフィアライト　Ｃ-ペプチド	三洋化成工業（株）
ルミパルスＣ-ペプチド	富士レビオ（株）
ルミパルスプレストＣ-ペプチド	富士レビオ（株）

４-２ 共同実験

４-２-１ 測定試料

C-ペプチド測定には、委員施設にてプール血清を準備し、実試料標準物質の候補とした。また、試料の調製は HECTEF SRC に委託した。

表２　第３回共同実験測定試料

試料		例数・濃度
1	患者ﾌﾟｰﾙ血清	５サンプル（５濃度）
2	健常人血清	22 サンプル
	計	27 サンプル

４-２-２．測定方法

校正は各社の所定の方法で実施し、４-２-１ の測定試料を検体として各々２重測定し，各平均値（「報告値」）を用い結果の解析を行った（別紙１）。

患者プール血清の安定性については，３社４試薬を用いて各社校正に基づき２重測定を実施した。５濃度の試料を到着時，１週，１ヶ月，２ヶ月後の４回測定し，その平均値について，初回測定値を 100%とし，経時的変動を調べた。

４-２-３．測定結果

患者プール血清の濃度をトレーサブルな複数のキットの報告値平均から求めた。即ち，第１回および第２回の共同研究結果から，WHO 84/510、患者プール血清いずれにおいても校正可能な５試薬（試薬 F，G，H，I，J）の平均値を算出し，これを「目標値」とした。プール血清における各試薬の相関性（X 軸：目標値、Y 軸：各試薬の報告値）は，相関係数 0.993～1.000、傾き 0.873～1.252，切片-0.538～0.424 であった。傾き 0.9～1.1 範囲内は５/８試薬、同 0.8～1.2 範囲内は７/８試薬であった。また，校正前の健常人血清の相関性は（X 軸：目標値（５社健常人血清平均値)、Y 軸：各試薬の健常人血清報告値)，相関係数 0.997～1.000、傾き 0.937～1.148、切片-0.306～0.111 を示した。傾き 0.9～1.1 範囲内は７/８試薬であり，同 0.8～1.2 範囲内では８/８と全ての試薬が収束している。(別紙 2)

次に，上記のプール血清の目標値に対する各試薬の回帰式（傾き，切片）から，評価用試料である健常人血清の測定値を補正することによる校正効果を検討した。校正係数はプール血清の目標値に対する各試薬の傾きおよび切片を校正係数とし，「校正値」＝（「報告値」-切片）÷「傾き」により「校正値」を求めた（表３，別紙１）。

表３　校正係数

	試薬 C	試薬 D	試薬 E	試薬 F	試薬 G	試薬 H	試薬 I	試薬 J
傾き	1.252	0.873	1.013	1.120	0.991	0.937	0.925	1.026
切片	0.098	0.424	-0.538	0.029	-0.132	-0.126	0.246	-0.017

校正の結果、健常者血清の相関性は（X 軸：目標値（５社健常人血清平均値)、Y 軸：各試薬の校正値)，相関係数 0.997～1.000、傾き 0.917～1.206、切片-0.585～0.242 を示した。傾き 0.9～1.1 範囲内は７/８試薬であり，同 0.8～1.2 範囲内も変わらず７/８試薬であった。(別紙 3(1))

追加として，トレーサブルな５試薬での健常人血清校正値の平均を X 軸とし，各社の校正値を Y 軸とした相関性を確認した。相関係数 0.996～1.000、傾き 0.916～1.205、切片-0.584～0.243，傾き 0.9～1.1 範囲内は７/８試薬，同 0.8～1.2 範囲内７/８試薬と上記とほぼ同じ結果を示した。

（別紙 3(2)）

患者プール血清による校正で、校正前後何れも基準内であった試薬は 6 試薬（試薬 E，F，G，H，I，J）、校正により基準内となった試薬１試薬（試薬 C）、校正前基準内が校正により逆に基準外となった試薬 1 試薬（試薬 D）に分類され，前回（第２回）の共同実験と同等な校正結果が確認された。

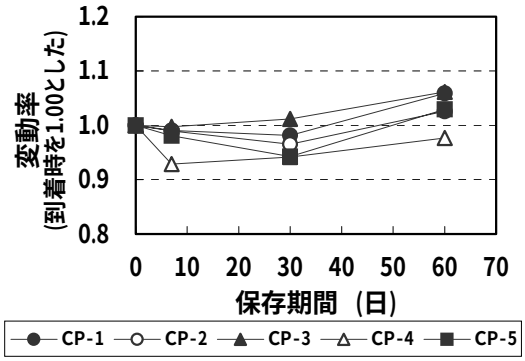
校正前（X 軸：報告値）後（Y 軸：校正値）での健常人血清測定値の相関性は，傾き 0.798～1.145、切片-0.486～0.531 であり，変化として傾き 0.9～1.1 の範囲内には６/８試薬，同 0.8～1.2 範囲内８/８試薬であった。（別紙４）

安定性試験においては、到着時を 100%とした場合の４試薬平均値の変動率は２ヶ月間保存後で 101%から 103%であった。これから、ユーザーにおいて一時保管に十分な期間である２ヶ月間の安定性に問題はないといえる。

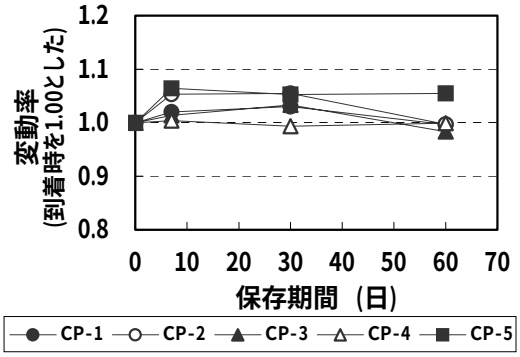
表　-20℃保存における 2 ヶ月間安定性

			測定値							変動率(到着時を100%とした)			
		試料名	到着時	1週間後	1ヶ月後	2ヶ月後	平均	SD	CV (%)	到着時	1週間後	1ヶ月後	2ヶ月後
試薬G	CP-1	C-ペプチド：患者プール血清1	1.62	1.60	1.59	1.71	1.63	0.056	3.5	100%	99%	98%	106%
	CP-2	C-ペプチド：患者プール血清2	3.32	3.28	3.20	3.40	3.30	0.083	2.5	100%	99%	97%	103%
	CP-3	C-ペプチド：患者プール血清3	5.55	5.53	5.61	5.89	5.64	0.165	2.9	100%	100%	101%	106%
	CP-4	C-ペプチド：患者プール血清4	5.82	5.40	5.48	5.68	5.59	0.190	3.4	100%	93%	94%	98%
	CP-5	C-ペプチド：患者プール血清5	9.84	9.65	9.27	10.13	9.72	0.358	3.7	100%	98%	94%	103%
試薬H	CP-1	C-ペプチド：患者プール血清1	1.51	1.54	1.55	1.50	1.52	0.024	1.6	100%	102%	103%	100%
	CP-2	C-ペプチド：患者プール血清2	3.19	3.36	3.36	3.18	3.27	0.103	3.1	100%	105%	105%	100%
	CP-3	C-ペプチド：患者プール血清3	5.42	5.49	5.60	5.33	5.46	0.114	2.1	100%	101%	103%	98%
	CP-4	C-ペプチド：患者プール血清4	5.30	5.32	5.27	5.30	5.30	0.023	0.4	100%	100%	99%	100%
	CP-5	C-ペプチド：患者プール血清5	9.30	9.89	9.79	9.81	9.69	0.270	2.8	100%	106%	105%	105%
試薬I	CP-1	C-ペプチド：患者プール血清1	1.75	1.80	1.89	1.83	1.81	0.057	3.1	100%	103%	108%	104%
	CP-2	C-ペプチド：患者プール血清2	3.71	3.56	3.85	3.87	3.74	0.145	3.9	100%	96%	104%	104%
	CP-3	C-ペプチド：患者プール血清3	5.83	5.72	6.19	6.07	5.95	0.214	3.6	100%	98%	106%	104%
	CP-4	C-ペプチド：患者プール血清4	5.42	5.21	5.67	5.68	5.49	0.226	4.1	100%	96%	105%	105%
	CP-5	C-ペプチド：患者プール血清5	9.54	9.32	10.17	9.98	9.75	0.389	4.0	100%	98%	107%	105%
試薬J	CP-1	C-ペプチド：患者プール血清1	1.81	1.90	1.85	1.82	1.84	0.042	2.3	100%	105%	102%	101%
	CP-2	C-ペプチド：患者プール血清2	3.61	3.79	3.67	3.62	3.67	0.084	2.3	100%	105%	102%	100%
	CP-3	C-ペプチド：患者プール血清3	6.04	6.46	6.17	6.07	6.18	0.193	3.1	100%	107%	102%	101%
	CP-4	C-ペプチド：患者プール血清4	5.88	6.22	6.04	5.88	6.00	0.164	2.7	100%	106%	103%	100%
	CP-5	C-ペプチド：患者プール血清5	10.33	10.40	10.40	10.23	10.34	0.081	0.8	100%	101%	101%	99%
4試薬平均	CP-1	C-ペプチド：患者プール血清1	1.67	1.71	1.72	1.71	1.70	0.022	1.3	100%	102%	103%	103%
	CP-2	C-ペプチド：患者プール血清2	3.45	3.50	3.52	3.52	3.50	0.031	0.9	100%	101%	102%	102%
	CP-3	C-ペプチド：患者プール血清3	5.71	5.80	5.89	5.84	5.81	0.077	1.3	100%	102%	103%	102%
	CP-4	C-ペプチド：患者プール血清4	5.60	5.54	5.61	5.63	5.60	0.041	0.7	100%	99%	100%	101%
	CP-5	C-ペプチド：患者プール血清5	9.75	9.81	9.90	10.03	9.87	0.123	1.2	100%	101%	102%	103%

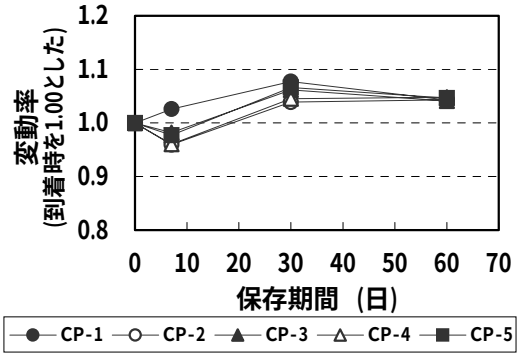
試薬G



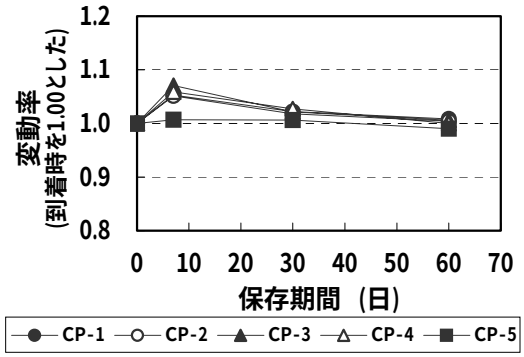
試薬H



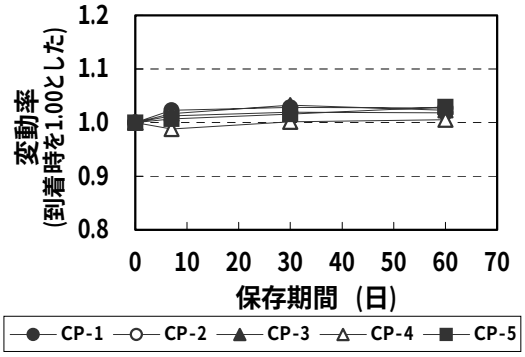
試薬I



試薬J



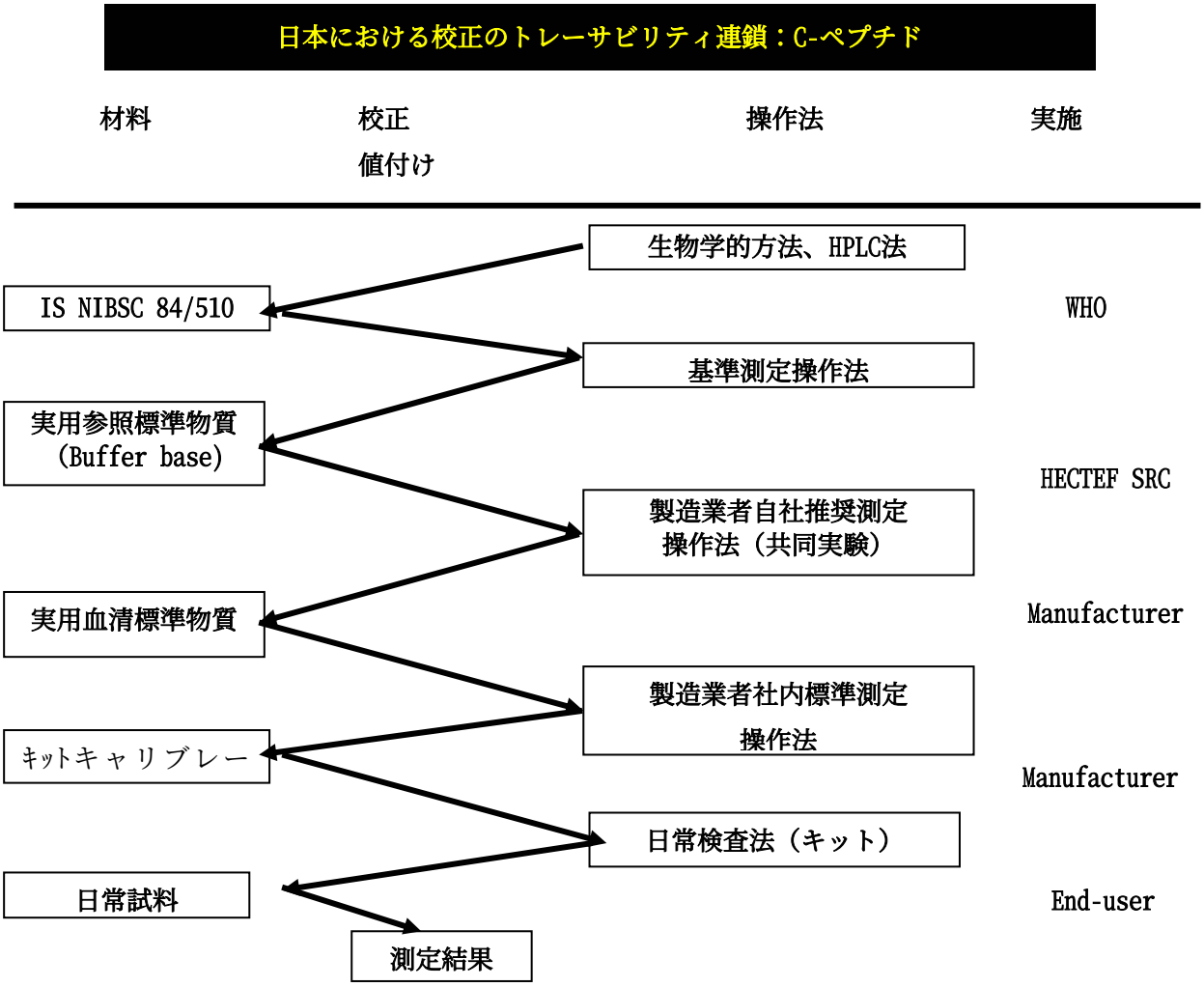
4試薬平均



5．実試料標準物質の作製プロトコル

5-1 トレーサビリティ連鎖

WHO(NIBSC 84/510)を最上位に位置付ける体系とした。しかし、前回の共同実験の結果でWHO(NIBSC 84/510)や市販純物質を用いた実試料標準物質では測定値の収束性を得ることは困難であった事から、校正効果が認められたプール血清を下位の標準物質とし、共同実験によりその値付けを行う体系とした。



5-2 試料の性状規格

今後、設定する。

5-3 値付けの方法

WHO(NIBSC 84/510)から直接値付け可能な試薬を共同実験により選択し、その試薬の平均値を実試料標準物質の認証値とする。

6．今後の課題

常用参照標準物質として、性状規格、基準測定操作法（上位物質となる IS NIBSC 84/510 を使用濃度に合わせて用時に既定の性状の溶媒に計り込む)、値付けの手順、認証値と不確かさ等も含めて実試料系標準物質の作製プロトコルを完成することで、応用が期待される。

7．結び

平成 19 年度の作業において、実試料標準物質を試作し、データの収束性が確認することができた。C-ペプチド標準化のための常用標準物質として、その有用性が実証できた。

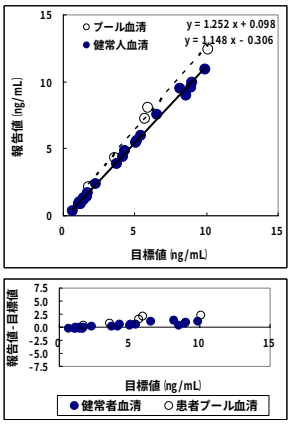
６．今後の課題

平成 19 年度の研究においては、実試料標準物質候補品として患者プール血清での測定値の収束性が再確認され，前回同様での結果を得た。今後はその作製プロトコルの作業および基準測定操作法の設定が必要である。

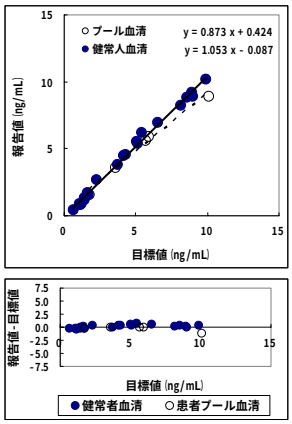
別紙１　C-ペプチド測定結果　報告値平均値／校正値平均／目標値

別紙２　目標値（5 試薬平均値）に対する報告値（実測値）

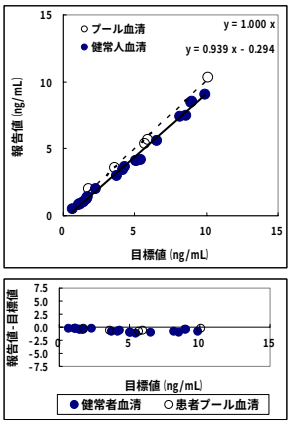
試薬 C



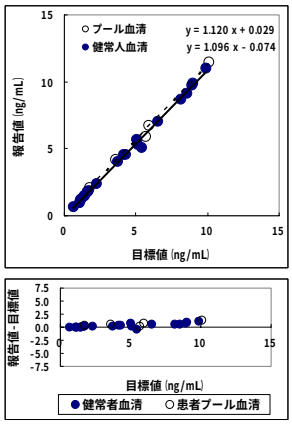
試薬 D



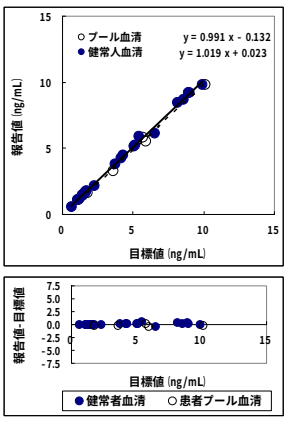
試薬 E



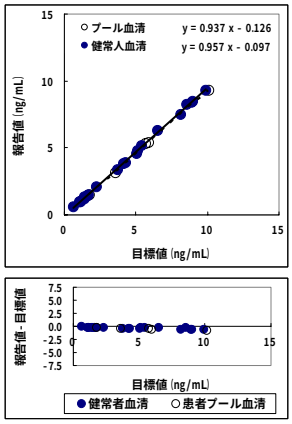
試薬 F



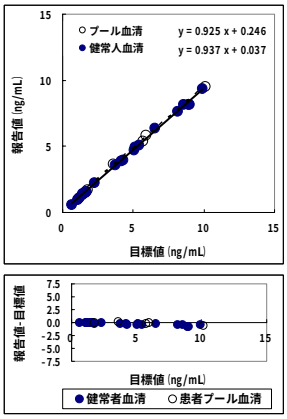
試薬 G



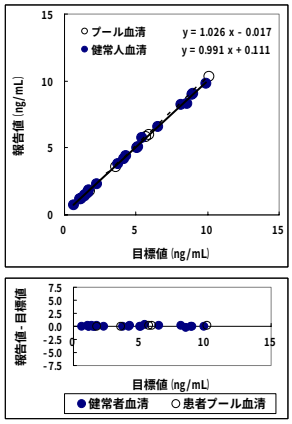
試薬 H



試薬 I

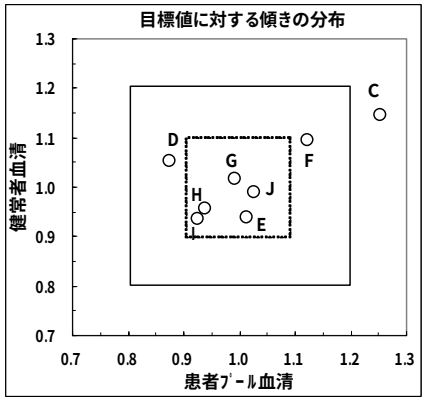


試薬 J



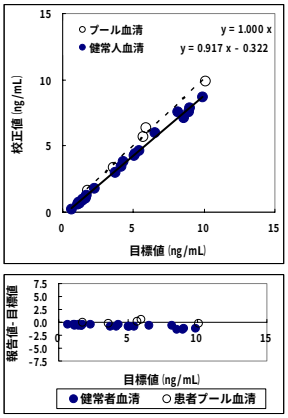
目標値に対する報告値　相関

	患者プール血清			健常者血清		
	r	傾き	切片	r	傾き	切片
試薬C	0.996	1.252	0.098	0.998	1.148	-0.306
試薬D	0.993	0.873	0.424	0.997	1.053	-0.087
試薬E	0.997	1.013	-0.538	0.997	0.939	-0.294
試薬F	0.998	1.120	0.029	0.998	1.096	-0.074
試薬G	0.998	0.991	-0.132	0.999	1.019	0.023
試薬H	1.000	0.937	-0.126	0.999	0.957	-0.097
試薬I	0.999	0.925	0.246	0.999	0.937	0.037
試薬J	1.000	1.026	-0.017	1.000	0.991	0.111
最小	0.993	0.873	-0.538	0.997	0.937	-0.306
最大	1.000	1.252	0.424	1.000	1.148	0.111

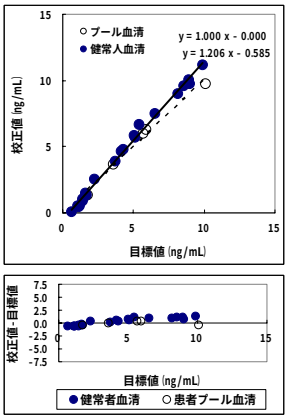


別紙３（１）　目標値（5 試薬 F-J 平均値）に対する校正値
（患者プール血清回帰式に基づき，（測定値-切片）／傾きによる補正値）

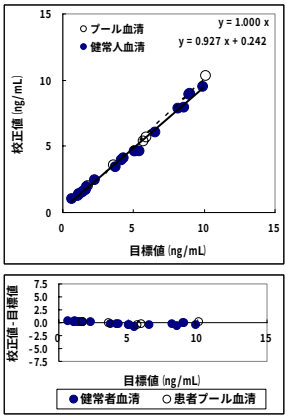
試薬 C



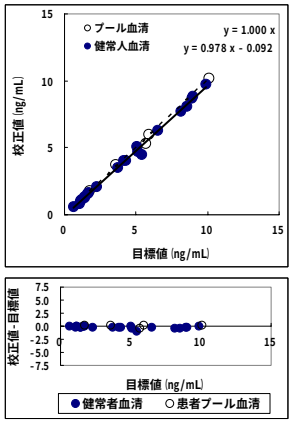
試薬 D



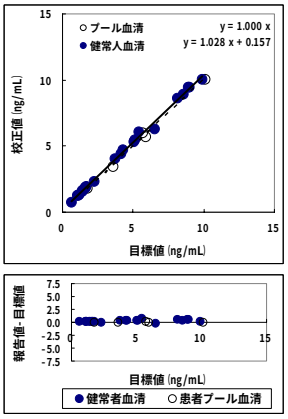
試薬 E



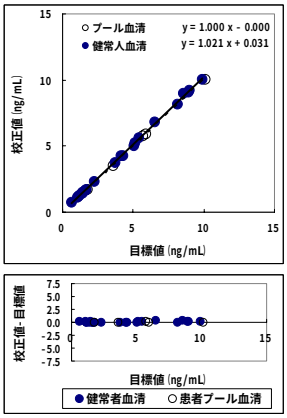
試薬 F



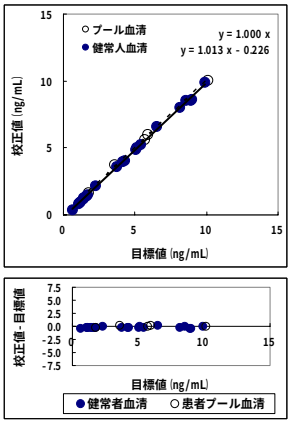
試薬 G



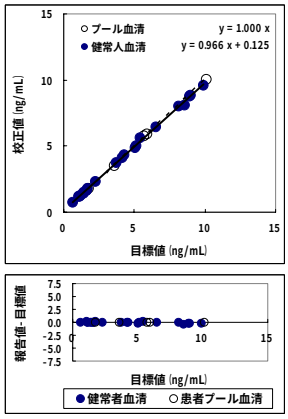
試薬 H



試薬 I

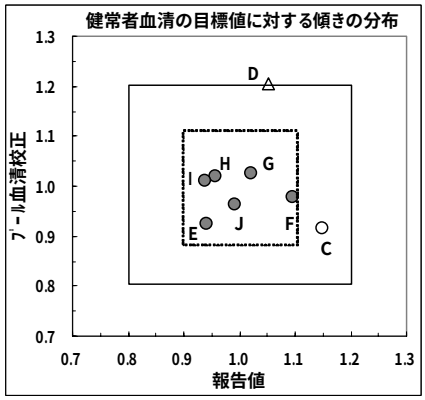


試薬 J



目標値に対する校正値　相関

	患者プール血清			健常者血清		
	r	傾き	切片	r	傾き	切片
試薬C	0.996	1.000	0.000	0.998	0.917	-0.322
試薬D	0.993	1.000	0.000	0.997	1.206	-0.585
試薬E	0.997	1.000	0.000	0.997	0.927	0.242
試薬F	0.998	1.000	0.000	0.998	0.978	-0.092
試薬G	0.998	1.000	0.000	0.999	1.028	0.157
試薬H	1.000	1.000	0.000	0.999	1.021	0.031
試薬I	0.999	1.000	0.000	0.999	1.013	-0.226
試薬J	1.000	1.000	0.000	1.000	0.966	0.125
最小	0.993	1.000	0.000	0.997	0.917	-0.585
最大	1.000	1.000	0.000	1.000	1.206	0.242



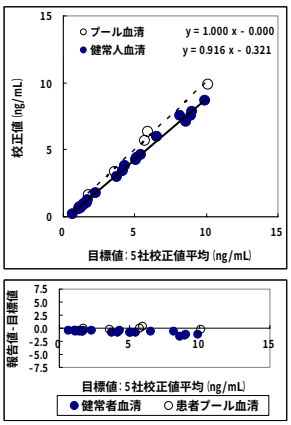
●：報告値，プール血清校正後共に目標値にあっている試薬(試薬 E，F，G，H，I，J)

○：プール血清校正による効果が認められる試薬(試薬 C)

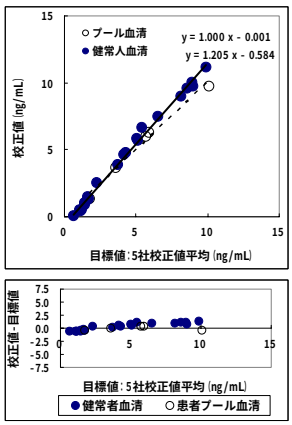
△：プール血清校正により乖離する試薬(試薬 D)

別紙３（２）　目標値（5 試薬 F-J 校正値平均；x）に対する校正値
（患者ﾌﾟｰﾙ血清回帰式に基づき，（測定値-切片）／傾きによる補正値）

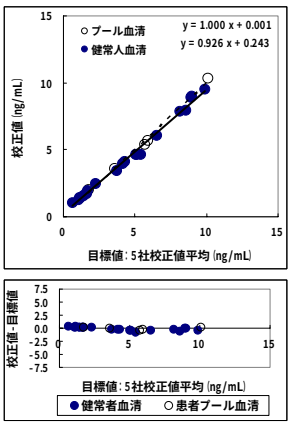
試薬 C



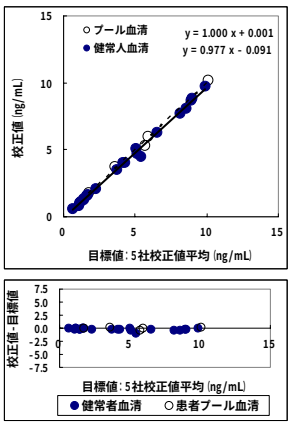
試薬 D



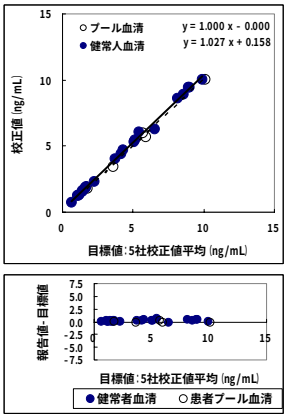
試薬 E



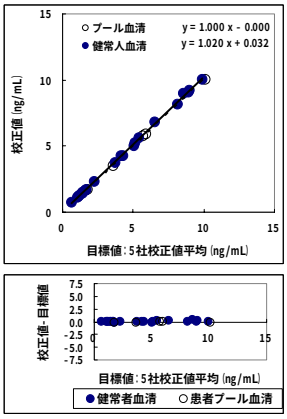
試薬 F



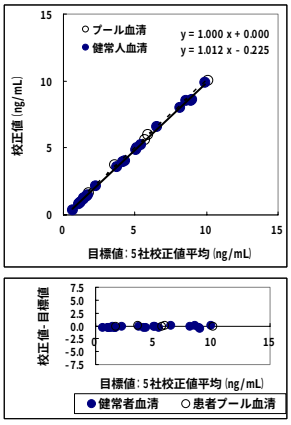
試薬 G



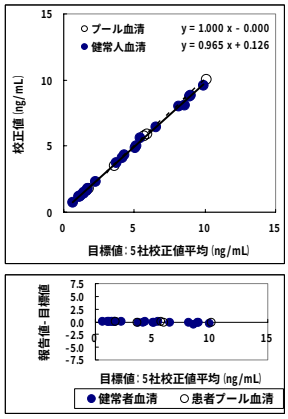
試薬 H



試薬 I

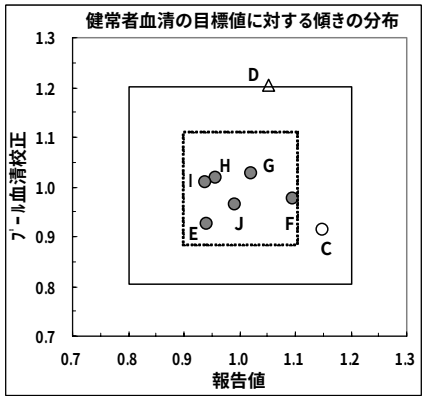


試薬 J



目標値に対する校正値　相関

	患者プール血清			健常者血清		
	r	傾き	切片	r	傾き	切片
試薬C	0.996	1.00	0.00	0.998	0.916	-0.321
試薬D	0.994	1.00	0.00	0.997	1.205	-0.584
試薬E	0.997	1.00	0.00	0.996	0.926	0.243
試薬F	0.998	1.00	0.00	0.998	0.977	-0.091
試薬G	0.998	1.00	0.00	0.999	1.027	0.158
試薬H	1.000	1.00	0.00	1.000	1.020	0.032
試薬I	0.999	1.00	0.00	0.999	1.012	-0.225
試薬J	1.000	1.00	0.00	1.000	0.965	0.126
最小	0.994	1.000	-0.001	0.996	0.916	-0.584
最大	1.000	1.000	0.001	1.000	1.205	0.243



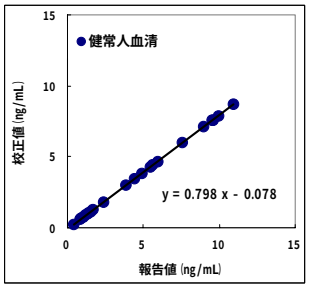
●：報告値，プール血清校正後共に目標値にあっている試薬(試薬 E，F，G，H，I，J)

○：プール血清校正による効果が認められる試薬(試薬 C)

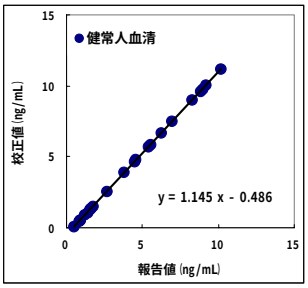
△：プールル血清校正により乖離する試薬(試薬 D)

別紙４　校正（患者プール血清回帰式に基づき,（測定値-切片）／傾きによる補正値）前後の健常人測定値比較

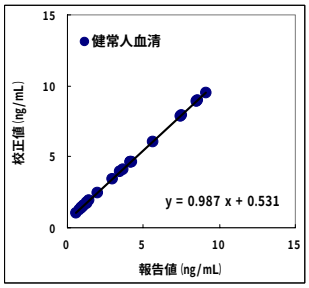
試薬 C



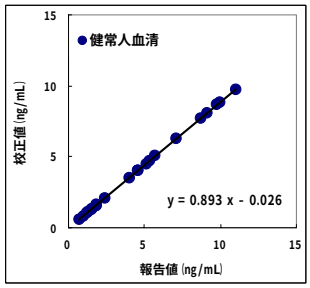
試薬 D



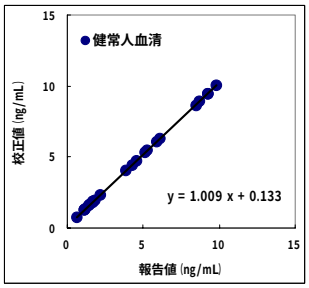
試薬 E



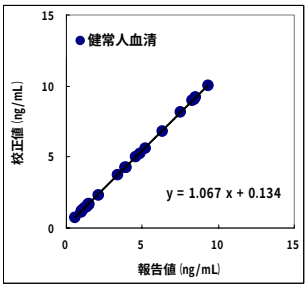
試薬 F



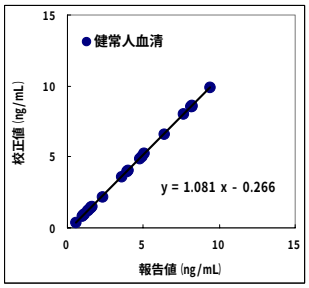
試薬 G



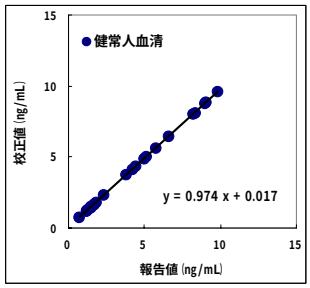
試薬 H



試薬 I



試 J



患者ﾌﾟｰﾙ血清による校正前後の健常人測定値　相関

	健常者血清		
	r	傾き	切片
試薬C	1.000	0.798	-0.078
試薬D	1.000	1.145	-0.486
試薬E	1.000	0.987	0.531
試薬F	1.000	0.893	-0.026
試薬G	1.000	1.009	0.133
試薬H	1.000	1.067	0.134
試薬I	1.000	1.081	-0.266
試薬J	1.000	0.974	0.017
最小	1.000	0.798	-0.486
最大	1.000	1.145	0.531

2-2-3-7　コルチゾール

要旨

1）共同実験により値付けしたプール血清を用いることで、実試料標準物質候補品としてデータ収束の有効な手段となりうるか検証した。

2）コルチゾールパネル血清表示値と各社の実測値で相関（傾きおよび相関係数）がもっとも良好の試薬を用いプール血清の値付けを行う。

3）値付けされたプール血清と各社キットの実測値を用い、各社キットの換算係数を求める。

4）求められた換算係数を用い、パネル血清実測値を換算することでデータ収束の可能性を検討した。

1．目的

コルチゾール測定におけるトレーサビリティ体系の構築および測定値の互換性を確保することを目標としてコルチゾール実試料標準物質の作製を目的とする。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者/アドバイザー	桑　　克彦	筑波大学大学院人間総合科学研究科
運営管理者（臨薬協）	望月　克彦	富士レビオ株式会社
柱 1／J2 担当	藤橋　和夫	日本臨床検査標準協議会
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	阪崎伸一郎	栄研化学株式会社
技術担当者	田野倉　修	株式会社テイエフビー
技術担当者	島名　春幸	協和メデックス株式会社
技術担当者	誉田　大仁	三洋化成工業株式会社
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	牧 浩司	東ソー株式会社
技術担当者	藤井　淳一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	林　司	株式会社カイノス
技術担当者	葉山 優	富士レビオ株式会社
技術担当者の交代について　以下の技術担当者が第 16 回会合より交代		
前任技術担当者	菊池　孝志	ロシュダイアグノスティックス株式会社
後任技術担当者	下川洋太郎	ロシュダイアグノスティックス株式会社
前任技術担当者	月本 あつ子	ベックマン・コールター株式会社
後任技術担当者	西村　和子	ベックマン・コールター株式会社

３．委員会の開催

⑪ 第 13 回会合：2007/05/28（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑫ 第 14 回会合：2007/07/10（火）12：30～14：30　（KSP　704 会議室）
⑬ 第 15 回会合：2007/09/18（火）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑭ 第 16 回会合：2007/11/08（木）15：00～17：00　（T-CAT 箱崎　会議室）
⑮ 第 17 回会合：2008/02/22（金）10：00～12：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１　コルチゾールパネル血清　IRMM ERM-DA451-1～IRMM ERM-DA451-3 の値付けされた濃度と各社の実測値で相関性を検討し、最も良好な傾きおよび相関係数の試薬を基準試薬とした。

各社キットの実測値とコルチゾールパネル血清の相関の結果は、傾きは 0.637～1.094、相関係数は 0.848～0.994 であった（別紙１）。
上記の結果、傾き、相関係数とも最も良好であったＣ社キット（傾き 1.094、相関係数 0.994）を基準キットとした。

４-２　基準試薬を用いたプール血清の実測値をプール血清の濃度とし、得られたプール血清コルチゾール値と各社キットの実測値より各社キットの換算係数を算出した。

プール血清をＣ社キットで測定した実測値をプール血清の濃度として値付けし、各社キットでの実測値と散布図を作製したのち、各社キットの基準キットに対する換算係数を算出した（表１、別紙２）。
結果、換算係数は下記のように得られた。

各社の換算係数　表１

各社キット	換算係数
Ａ社	0.953
Ｂ社	1.206
Ｃ社（基準キット）	1.000
Ｄ社	1.035

４-３　得られた各社キットの換算係数を用い、コルチゾールパネル血清　IRMM ERM-DA451-1～IRMM ERM-DA451-34 の実測値に対し４-２で得られた換算係数を用い換算しデータ収束性を検討した。

換算した濃度による各社キットの換算値のＣＶ %は 1.61～20.24 %範囲に収束した。しかし、

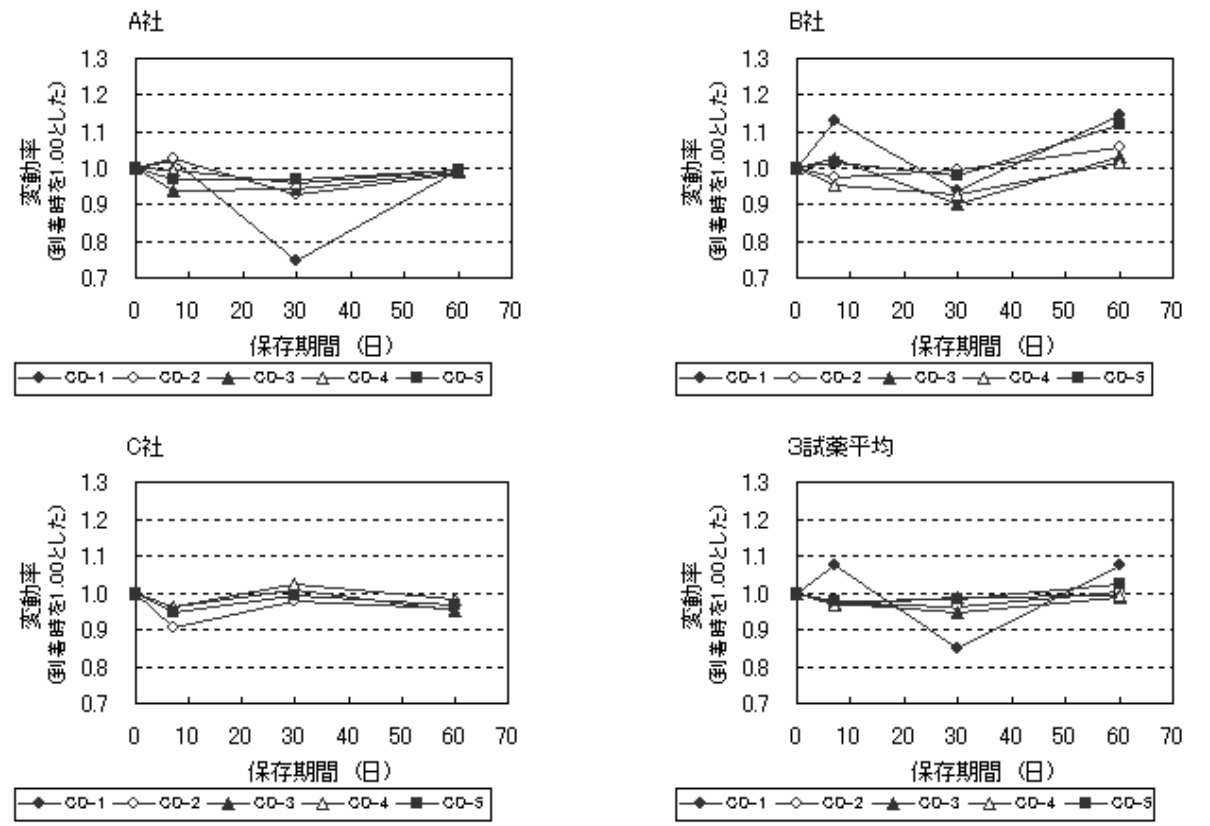
パネル血清に対する近似曲線を求めたところ C 社と他社で傾きに違いが見られた（別紙４）。
この違いが収束性全体によるものか、一部の試料による影響によるものかを確認するためＣＶ %が 10 %以下の試料（24 試料）により再度近似曲線を求めたところ傾きは 1.0732～1.2262、相関係数は 0.956～0.998 とデータは収束した（別紙５）。
特定のキットを用いプール血清に値付けを行い、各社で換算係数を求めることでデータ収束が可能であることが示唆された。
しかし、特定の試料においては収束できず、今後これら収束しない試料に対する対処の必要性が示唆された。

使用した患者プール血清の安定性試験においては、到着時を 100 %とした場合の３試薬平均値の変動率は２ヶ月間保存後で 95 %から 113 %であった（乖離が大きいものに関しては CV %が大きくばらつきによる影響と思われる）。これから、ユーザーにおいて一時保管に十分な期間である２ヶ月間の安定性に問題はないといえる（表２，図１）。

コルチゾール安定性試験　表２

			測定値							変動率(到着時を100%とした)			
		試料名	到着時	1週間後	1ヶ月後	2ヶ月後	平均	SD	CV (%)	到着時	1週間後	1ヶ月後	2ヶ月後
A社	CO-1	コルチゾール:患者プール血清1	0.29	0.29	0.21	0.28	0.27	0.036	13.6	100%	102%	75%	99%
	CO-2	コルチゾール:患者プール血清2	1.60	1.64	1.49	1.58	1.58	0.067	4.2	100%	102%	93%	99%
	CO-3	コルチゾール:患者プール血清3	4.46	4.18	4.20	4.40	4.31	0.143	3.3	100%	94%	94%	99%
	CO-4	コルチゾール:患者プール血清4	7.85	7.80	7.52	7.80	7.74	0.147	1.9	100%	99%	96%	99%
	CO-5	コルチゾール:患者プール血清5	18.13	17.59	17.57	18.06	17.84	0.299	1.7	100%	97%	97%	100%
B社	CO-1	コルチゾール:患者プール血清1	0.31	0.35	0.29	0.36	0.33	0.031	9.6	100%	113%	94%	115%
	CO-2	コルチゾール:患者プール血清2	1.49	1.45	1.48	1.57	1.49	0.054	3.6	100%	97%	99%	106%
	CO-3	コルチゾール:患者プール血清3	3.84	3.94	3.45	3.95	3.79	0.233	6.1	100%	103%	90%	103%
	CO-4	コルチゾール:患者プール血清4	6.94	6.62	6.45	7.06	6.77	0.281	4.2	100%	95%	93%	102%
	CO-5	コルチゾール:患者プール血清5	14.32	14.54	14.01	16.04	14.72	0.904	6.1	100%	102%	98%	112%
C社	CO-1	コルチゾール:患者プール血清1	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02							
	CO-2	コルチゾール:患者プール血清2	1.18	1.07	1.15	1.13	1.13	0.046	4.1	100%	91%	97%	96%
	CO-3	コルチゾール:患者プール血清3	3.79	3.64	3.81	3.61	3.71	0.101	2.7	100%	96%	101%	95%
	CO-4	コルチゾール:患者プール血清4	18.99	18.27	19.38	18.63	18.82	0.479	2.5	100%	96%	102%	98%
	CO-5	コルチゾール:患者プール血清5	17.49	16.57	17.34	16.87	17.07	0.424	2.5	100%	95%	99%	96%
3試薬平均	CO-1	コルチゾール:患者プール血清1	0.30	0.32	0.25	0.32	0.30	0.032	10.8	100%	108%	85%	107%
	CO-2	コルチゾール:患者プール血清2	1.42	1.39	1.37	1.43	1.40	0.028	2.0	100%	97%	96%	100%
	CO-3	コルチゾール:患者プール血清3	4.03	3.92	3.82	3.98	3.94	0.091	2.3	100%	97%	95%	99%
	CO-4	コルチゾール:患者プール血清4	11.26	10.89	11.12	11.16	11.11	0.154	1.4	100%	97%	99%	99%
	CO-5	コルチゾール:患者プール血清5	16.65	16.23	16.30	16.99	16.54	0.348	2.1	100%	98%	98%	102%

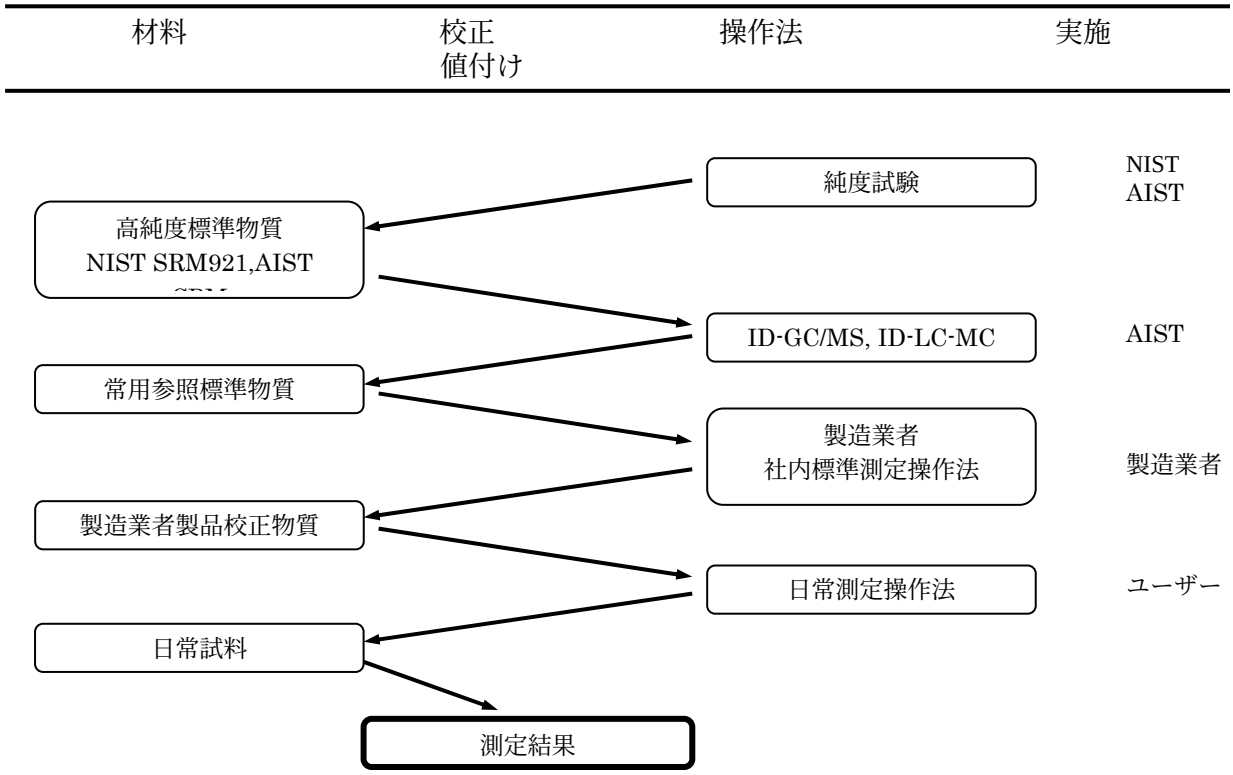
コルチゾール安定性（図１）



４-４校正のトレーサビリティ

前回の共同実験の結果市販純物質を用いた実試料標準物質では測定値の収束性を得ることは困難であった事から、校正効果が認められたプール血清を下位の標準物質とし、共同実験によりその値付けを行う体系とした。

日本における校正トレーサビリティ連鎖：コルチゾール



５．今後の課題

コルチゾールの場合、高濃度域と低濃度域が臨床的には重要になる。
特に臨床的に問題になっている低濃度域における濃度の条件および規格を設定することを期待される。

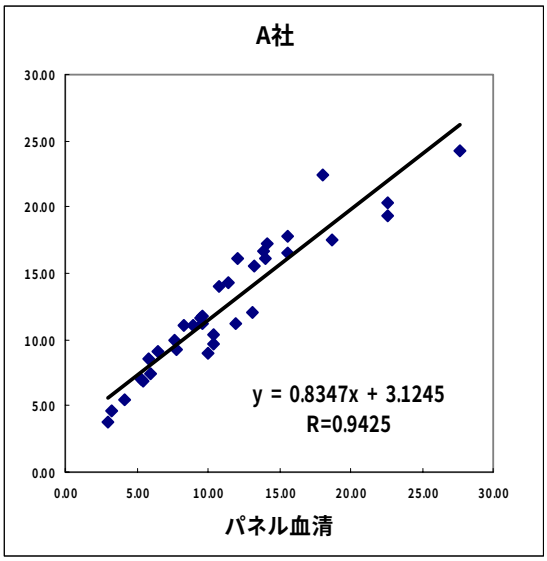
また、抗原抗体反応を利用した免疫法の場合、各試薬が使用している抗体により外的要因による影響が異なり、実重量より求める GC/MS との差異が生じる場合がある。
今後、これら外的要因による影響の除外も含めた標準化が期待される。

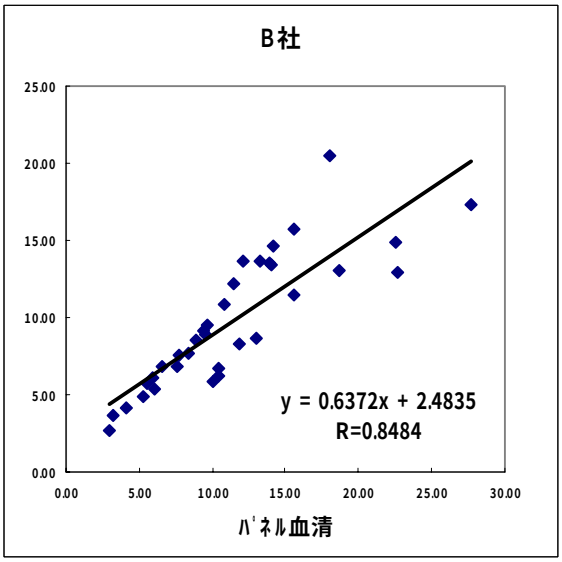
６．結び

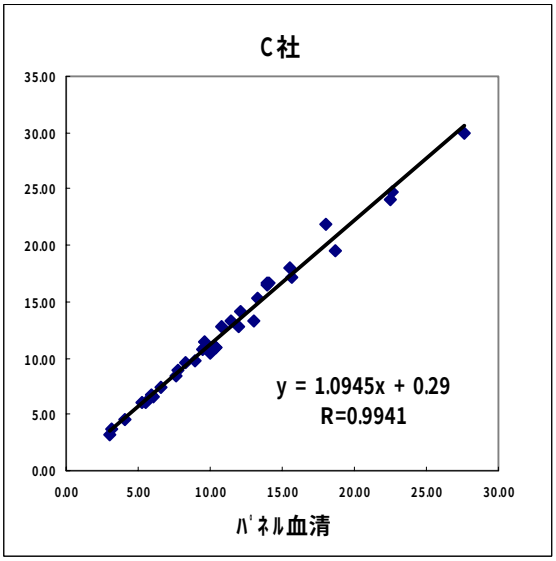
今後、試薬の反応性の違いを明らかにして上で個々の試料に対してその影響に有無が事前に把握できる環境であれば、換算係数などを用いることで各社間のデータを収束させる可能性がある。
また、今回の共同実験においては、ステロイド薬剤の影響については、検討対象より除外しているが、除外せずに対象に含めたほうが良いとの考え方もある。

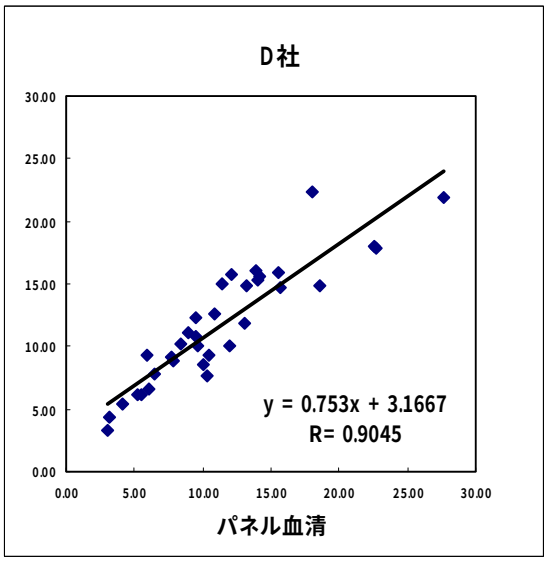
別紙１

コルチゾールパネル血清と各社実測値相関



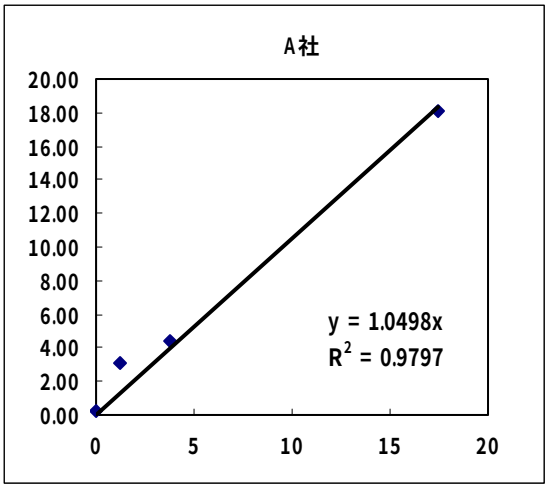


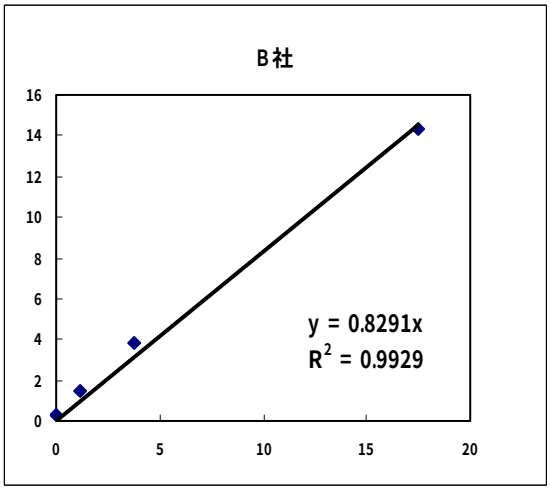


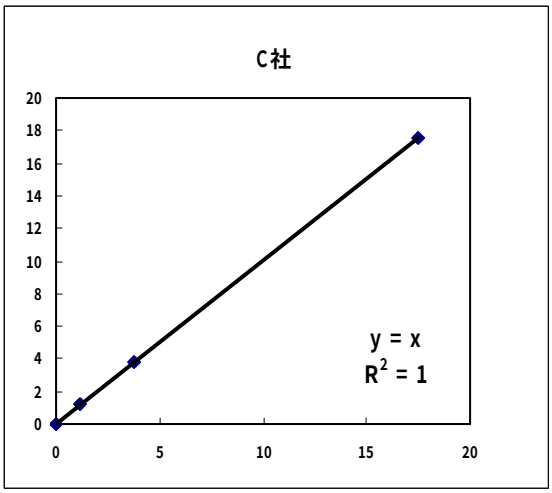


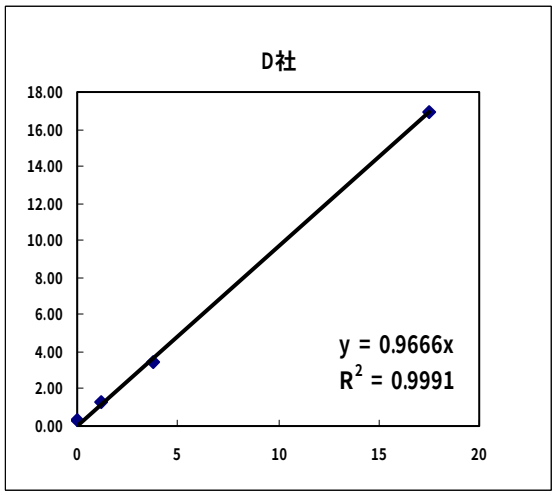
別紙２

C 社キットで値付けされたプール血清との相関（y 切片０）



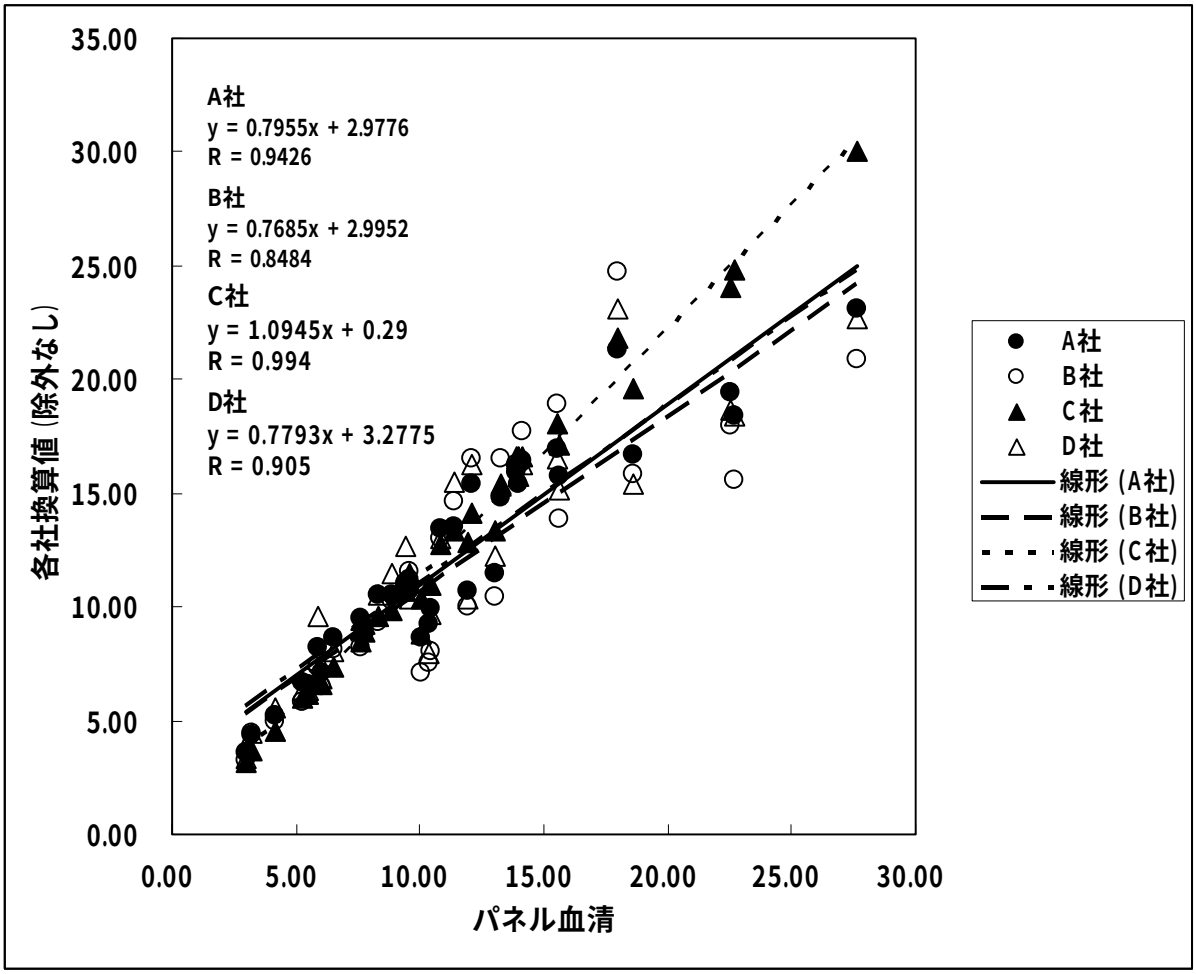






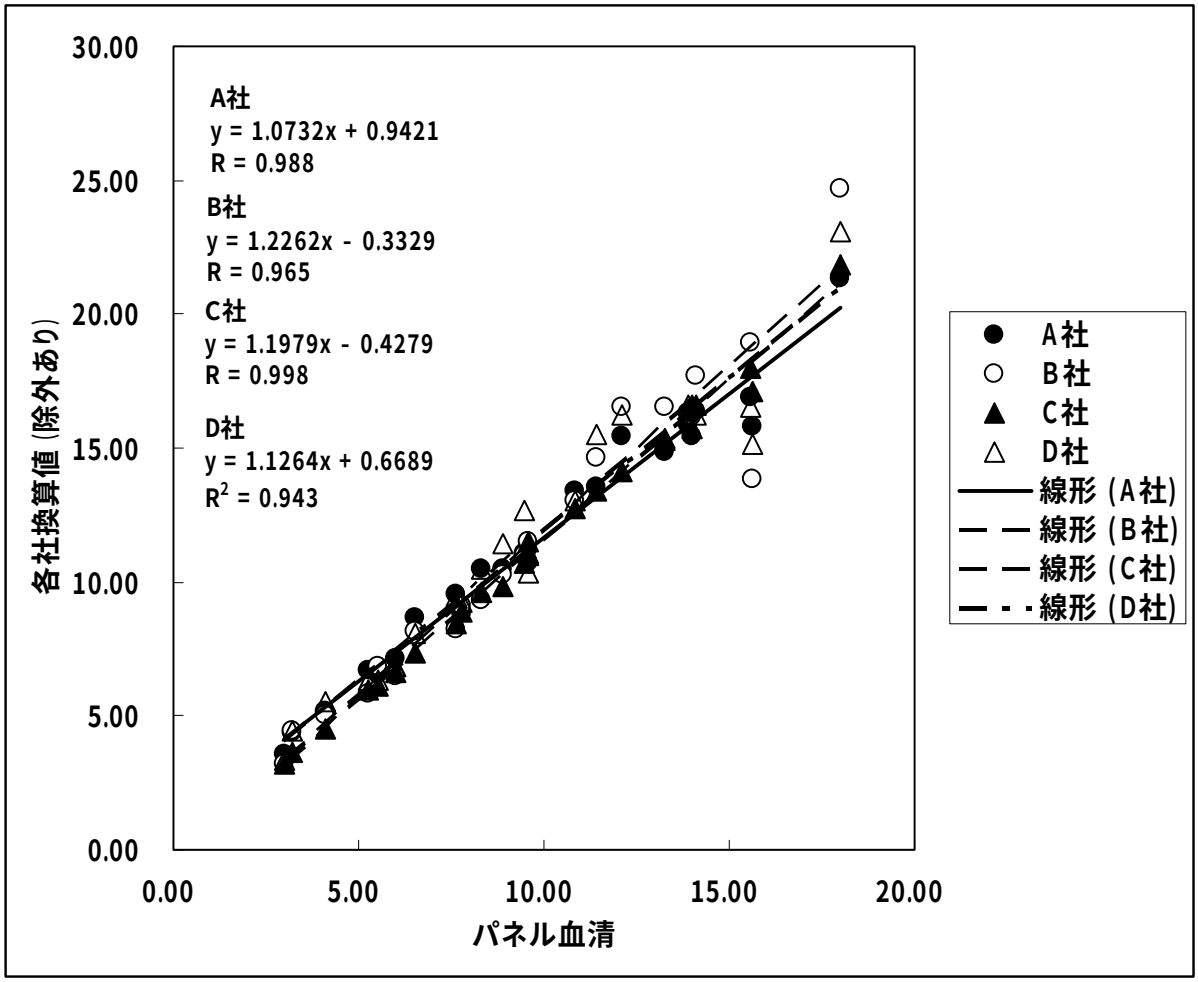
別紙４

パネル血清と各社換算値との相関（除外なし）



別紙５

パネル血清と各社換算値との相関（ＣＶ10%以上を除外した場合）



７．追記：同位体希釈質量分析法によるプール血清中コルチゾールの定量

A1. 緒言

同位体希釈質量分析法(IDMS)は計量学的な見地から一次標準測定法とされる信頼性の高い分析法の一つであり、臨床検査分野においても、総コレステロールやグルコースなどについて血清標準物質（常用参照標準物質）の値付け方法として用いられている。そこで、今回の共同実験に用いたプール血清試料について、同位体希釈質量分析法によるコルチゾール定量を行い、臨床検査試薬での測定結果との比較を行った。

A2. 研究担当者

産業技術総合研究所計測標準研究部門有機分析科バイオメディカル標準研究室
川口研、加藤尚志、高津章子

A3. 実験

A3-1 測定の概略

同位体希釈質量分析法は、試料に測定対象物の同位体化合物を既知量添加し、得られた混合試料中の測定対象物の同位体比の測定から、天然化合物と加えた同位体化合物との質量比を求め、試料中の化合物濃度を算出する方法である。今回、測定法としては, 比較的濃度の高い３試料については、同位体希釈-ガスクロマトグラフィ/質量分析法(ID-GC/MS)を、低濃度の２試料に関しては、同位体希釈-液体クロマトグラフィ/質量分析法(ID-LC/MS)を用いた。また、濃度の基準とするコルチゾールとして、本プロジェクトで開発中のコルチゾール純物質系標準物質（純度値は暫定）を用いた。

A3-2　同位体希釈-ガスクロマトグラフィ/質量分析法(ID-GC/MS)

安定同位体標識化合物である cortisol-d2[1,2]は, ケンブリッジアイソトープ社から購入したものを用いた。 同位体標識化合物と分析対象物質のピーク面積比が 1:1 となるように cortisol-d2 を血清に添加し､約２時間の安定化後, Waters 社製 Oasis HLB (30 mg/Lcc)を用いて固相抽出を行った。固相抽出の溶出液を窒素気流下で乾固させ、残渣をアセトン(30 μL)で溶解させ, ヘプタフルオロ酪酸無水物(HFBA, 30 μL)を添加し, 室温で 4 時間反応させ誘導体化を行った。反応物は, 窒素気流下で乾固させた後, シクロヘキサン(20 μL)に再溶解させ, その 2 μL を GC/MS に供した(n = 6)。

ガスクロマトグラフ/質量分析法の測定条件は下記である。

・GC/MS 装置：Agilent Technologies 社製 6890N GC および 5973 inert
・GC 用カラム：J&W 社製 DB-5ms(0.25 mm x 30 m, 膜厚 0.25 μm)
・注入方法：Pulsed splitless (20 psi, 0.9 min)
・オーブン温度：60 ℃ → 15 ℃/min → 300 ℃ [9 min]
・キャリアーガス：He 1.0 ml/min

・モニターイオン：m/z = 489, 504 (cortisol), m/z = 491 (cortisol-d2)

A3-3　同位体希釈-高速液体クロマトグラフィ/質量分析法（ID-LC/MS/MS）

安定同位体標識化合物には d4-cortisol（ケンブリッジアイソトープ社製）を用いた。同位体標識化合物と分析対象物質のピーク面積が 1:1 になるように血清中に添加し，3 時間の安定化時間の後に OasisHLB（Waters，30 mg/L cc）固相抽出剤による前処理を行った。メタノール分画を窒素気流により乾固させたのち 0.5 mL の Milli-Q 水と 1 ml の酢酸エチル溶液を加えて 1 分間ボルテックス攪拌を行った。攪拌後，遠心分離により得られた酢酸エチル相を取り除いた後，水相に再び酢酸エチル 1 mL を加え，同様の操作を行った。得られた酢酸エチル相は窒素気流下で乾固させ，残渣をメタノール 100 μL で再溶解して LC/MS/MS に供した。注入量は 5 μL（*n*=6）とし，特定の前駆イオンから生じる特定の生成イオンを測定する Selected reaction Monitoring（選択反応モニタリング SRM）モードによる測定を行った。その他の条件は以下の通りである。

・ LC/MS/MS 装置：Thermoelectron 社製　TSQ Quantum Discovery MAX
・ LC 用カラム：Imtakt 社製　CadenzaC-18（2.0 mm i.d. x 25 cm, 粒径 3 μm）
・ カラム温度：40 ℃
・ 移動相溶液：A: 0.1% 酢酸水溶液　B: アセトニトリル
・ グラジエント条件：

0- 5 min	B 30 %
5-15 min	B 30 % → 40 %
15-20 min	B 40 % → 100 %
20-30 min	B 100%

・ モニターイオン：m/z=363/121（cortisol），m/z=367/121（d4-cortisol）

A4. 結果

IDMS によるプール血清の測定結果を Table 1 に示す。血清の比重を、NIST から配布されている凍結乾燥血清 SRM909b を参考に 1.02955 g/mL として単位換算し、IDMS および各社臨床検査キットによって得られた測定値を比較したところ、各社臨床検査キットの測定値が若干高い値を示したが、２つの測定値の間にはよい相関が見られた(Table 2, Fig.)。

Table 1　IDMS によるプール血清の測定結果

サンプル	方法	濃度（ng/g)	不確かさ(ng/g)
CO-1	ID-LC/MS/MS	1.253	0.060
CO-2	ID-LC/MS/MS	8.34	0.50
CO-3	ID-GC/MS	28.18	0.62
CO-4	ID-GC/MS	52.47	1.15
CO-5	ID-GC/MS	151.1	3.3

Table 2　IDMS と各社臨床検査試薬による測定値の比較（μg/dL）

サンプル	ID-MS	A 社	B 社	C 社	D 社
CO-1	0.129	0.29	0.31	0.018	0.28
CO-2	0.859	3.1	1.485	1.18	1.3
CO-3	2.90	4.46	3.835	3.785	3.4075
CO-4	5.40	7.85	6.935		7.996
CO-5	15.56	18.13	14.315	17.49	16.95
ID-MS との相関係数	-	0.993	0.991	0.999	0.992
近似線の傾き	-	1.096	0.886	1.116	1.078
近似線の切片	-	1.319	0.973	0.193	0.629

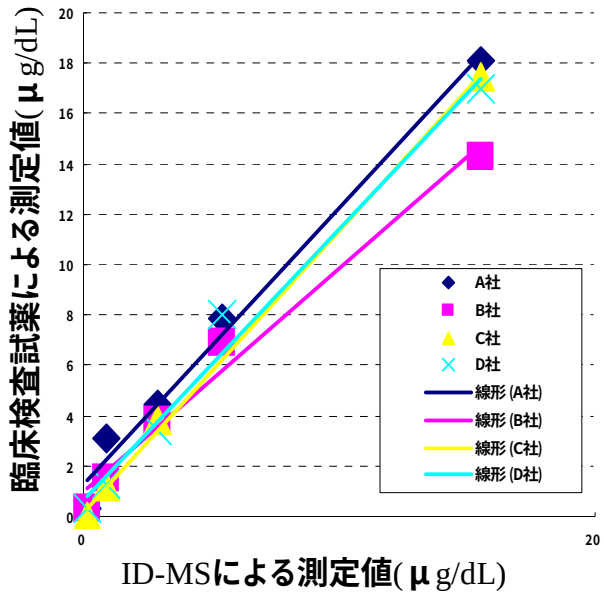


Fig. ID-MS**及び各社臨床検査試薬の測定値の相関性**

2-2-3-8　　HDL コレステロール、LDL コレステロール

要旨

1）血清 HDL コレステロール（HDL-C)、血清 LDL コレステロール（LDL-C）の測定において、市販試薬のデータの収束性を可能にするため平成 17 年度、18 年度の検討結果に基づいて、新鮮ヒトプール血清による効果の確認および作製方法について検討した。

2)直接法試薬を製造している 6 社を中心に新鮮ヒトプール血清 10 種類を作製し､収束性の検討、使用した各血清の性状、安定性についても併せて調査し実試料標準物質候補品の性状規格（案)、試料調製方法（案）を設定した。作製した試料の電気泳動パターンを確認して用いることで、収束性が向上する試料の作製の可能性が示唆された。

3）実試料標準物質の候補品の性状規格（案）の中で最も重要なのは電気泳動パターンが正常であるということであり、絶対条件である。HDL-C、LDL-C はともにリポ蛋白中に存在するコレステロールであり、そのリポ蛋白の状態等により測定試薬の反応性が大きく変わる場合があるので、試料作製の際の選別およびその後の保管には細心の注意が必要である。

4）上記の検討結果より、目的の候補品の作製方法、性状規格（案）についてのガイドラインを提示することができたが、新鮮なヒト血清の入手にはボランティアの協力が必要であるために現実的には小グループでの使用に限定される。

今後、これら実試料タイプの標準物質の作製に際しての大きな課題として、新鮮なヒト血清の入手ルートの確立、が先ず必要である。

1．目的

本実試料項目群、Ｊ１（HDLコレステロール、LDLコレステロール）では、血清HDLコレステロールおよびLDLコレステロールの実試料系標準物質の作製を行い、市販試薬におけるデータの標準化、収束性を可能にすることを目的とする。

2．委員会の構成

本委員会は、実試料系標準物質項目群の柱１　Ｊ１・ＷＧで、メンバーの構成を下記に記す。

委員長	櫻林　郁之介（自治医科大学）
委員長代理	濱崎　直孝（長崎国際大学）
アドバイザー	桑　　克彦（筑波大学）
	栢森　裕三（九州大学）
	森下　芳孝（名古屋大学）
委員	山下　章吾（アークレイ（株)）
	保田　徹（オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス（株)）
	大和　隆（協和メデックス（株)）
	岸　　浩司（シスメックス（株)）
	芳村　一（(株）シノテスト）

根占　哲也（(株）セロテック）
齋藤　和典（第一化学薬品（株））
斉藤　憲祐（デイドベーリング（株））
上村　武司（(株）テクノメディカ）
伊藤　康樹（デンカ生研（株））
松井　寛史（デンカ生研（株））
武内　剛（(株）ビーエムエル）
杉原　充　（富士フイルム（株））
横田　敦子（ベックマン・コールター（株））
吉海　毅（ロシュ・ダイアグノスティックス（株））
花田　寿郎（和光純薬工業（株））
事務局　藤橋　和夫（日本臨床検査標準協議会）

３．委員会の開催

第 10 回会合	2007 年 09 月 10 日（月）13:00～15:30（日本臨床検査薬協会会議室）
責任者会議	2007 年 09 月 26 日（水）17:00～18:30（日本臨床検査薬協会会議室）
第 11 回会合	2007 年 09 月 27 日（木）13:00～15:00（パシフィコ横浜会議センター）
責任者会議	2007 年 10 月 08 日（月）16:00～18:30（栄研化学東京営業所）
幹事会	2007 年 10 月 09 日（火）13:00～15:00（日本臨床検査薬協会会議室）
責任者会議	2007 年 11 月 13 日（火）11:00～12:00（日本臨床検査薬協会会議室）
第 12 回会合	2008 年 02 月 18 日（月）15:00～17:00（日本臨床検査薬協会会議室）

４．標準物質の設定概要

2007 年度は、2005、2006 年度の検討結果から、現在市販のキャリブレー、コントロールおよびNCCLS（C37-A）に基づいて調製したプール血清ではなく、新鮮ヒトプール血清に絞った検討を行った。HDL-C はαリポ蛋白（高比重リポ蛋白）中の、LDL-C はβリポ蛋白（低比重リポ蛋白）中の総コレステロールであり、リポ蛋白の多様性、安定性から考えて、物質的に明確になっている項目とは異なった考え方、取り組み方が必要である。

４‐１　実験計画書

４‐１‐１　新鮮ヒトプール血清の作製

TG 200 mg/dL 以下のボランティアから採血した直後に 5～10 名の血清をプールし（約 50 mL）、プレフィルターでろ過後セラムチューブ（1.8 mL 用）に 0.5 mL 分注し-70 ℃で 2 昼夜保存。その後-20 ℃と-70 ℃に分けて保存し検討に用いた。本方法により 10 種類の新鮮ヒトプール血清を作製した。

４‐１‐２　測定項目

HDL-C、LDL-C の測定には 6 社の直接法試薬を用い、同時に新鮮ヒト血清（試験当日採血）10

種類も同時に測定し収束性の判断基準とした。

その他生化学項目として、AST、ALT、TG、TC、UA、TP、ALB、T-Bil、D-Bil、アポ蛋白（AⅠ、AⅡ、B、CⅡ、CⅢ、E）を、および外観の濁りの程度の指標として試料の波長 660 nm の吸光度を測定した。また、リポ蛋白の状態把握のためにアガロース電気泳動、アクリルアミド電気泳動パターンの確認を行った。

なお、上記測定項目は検討開始時にはプール血清作製に供した個々の血清についても行った。

４-１-３　測定

安定性の影響についても調査するために、新鮮ヒトプール血清作製後、約 2 週間後、4 ヶ月後、および 6 ヶ月後の 3 回実施した。

４-１-４　評価

作製した 10 種類の-20 ℃、-70 ℃保存品での直接法試薬 6 社の収束性を新鮮血清 10 検体を用いその都度測定し、昨年までと同様な作業により補正効果を確認し収束性の指標とした。尚、2006 年度に検討した米国からの凍結輸入血清により NCCLS（C37A）に基づいて作製した試料も参考として測定対象にいれて評価した。

また、収束性の挙動と上記測定項目との関連について検討し、実試料標準物質候補品の性状規格（案）設定を行った。

４-２　共同実験

４-２-１　新鮮ヒトプール血清の性状（表１、図１）

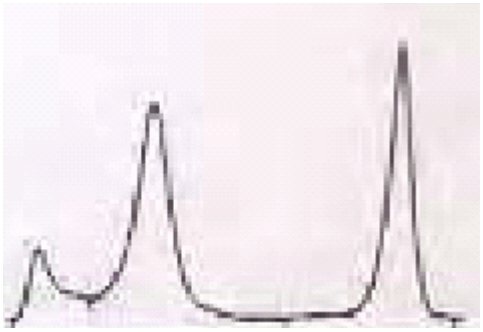
作製した新鮮ヒトプール血清の主な性状を表１に示した。TG：67～114 mg/dL、TC：151～211 mg/dL、AST：14～56 U/L、ALT：11～31 U/L、 UA：4.7～5.9 mg/dL、TP：6.6～7.2 g/dL、ALB：4.1～4.5 g/dL、T-Bil：0.5～0.9 mg/dL、D-Bil：0.1～0.2 mg/dL、ApoAⅠ：118～156 mg/dL、ApoAⅡ：27～33 mg/dL、ApoB：74～107 mg/dL、ApoCⅡ：1.9～4.4 mg/dL、ApoCⅢ：6.0～9.0 mg/dL、ApoE：2.9～4.4 mg/dL と何れもほぼ正常参考値範囲内であった。また、濁度の指標とした 660 nm の吸光度は 0.192～0.504 で、HDL-C、LDL-C は直接法試薬での平均値で、HDL-C：52.0～71.7 mg/dL、LDL-C：102～140 mg/dL であった。

尚、電気泳動パターンでは、正常ヒト血清と異なるパターンがアガロース電気泳動で、またアクリルアミド電気泳動ではミッドバンドが一部の試料で観察された（プール血清 No.9、図１）。

表１　新鮮ヒトプール血清の性状

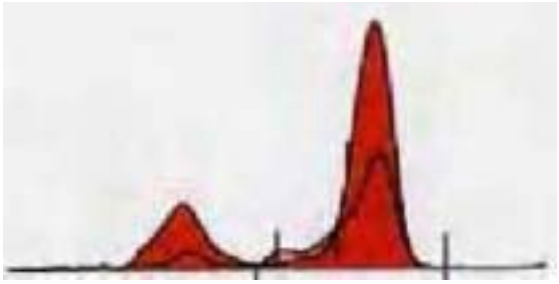
		プール血清 No.									
	（単位）	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AST	U/L	15	14	15	16	19	15	56	21	22	19
ALT	U/L	15	15	15	15	26	11	31	28	25	16
TG	mg/dL	67	74	103	114	106	79	73	87	113	112
TC	mg/dL	151	166	187	208	183	167	173	192	211	164
UA	mg/dL	5.1	5.1	4.7	4.9	5.9	4.7	5.8	5.1	5.7	4.8
TP	g/dL	6.6	6.8	7.1	7.2	6.9	6.9	6.9	7.1	7	6.9
ALB	g/dL	4.1	4.2	4.5	4.5	4.4	4.3	4.2	4.5	4.5	4.3
T-Bil	mg/dL	0.5	0.6	0.9	0.6	0.8	0.8	0.7	0.8	0.8	0.7
D-Bil	mg/dL	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
Apo AI	mg/dL	118	124	156	153	131	136	139	138	129	131
Apo AII	mg/dL	28	29	31	30	31	27	33	33	30	28
Apo B	mg/dL	74	84	78	90	89	77	79	92	107	76
Apo CII	mg/dL	1.9	2.4	2.5	4.2	3.1	2.3	3.2	3.3	4.4	3.5
Apo CIII	mg/dL	6.0	6.5	8.2	9.0	8.5	7.0	8.5	8.3	8.5	8.0
Apo E	mg/dL	2.9	3.1	3.4	3.3	3.6	4.0	3.5	2.9	4.4	3.2
吸光度（波長660 nm）		0.192	0.194	0.504	0.260	0.272	0.260	0.194	0.242	0.280	0.333
電気泳動　ﾎﾞﾗﾝﾃｨｱ血清		○	△	○	○	○	○	○	△	×	○
ﾌﾟｰﾙ血清		○	○	○	○	○	○	○	○	×	○

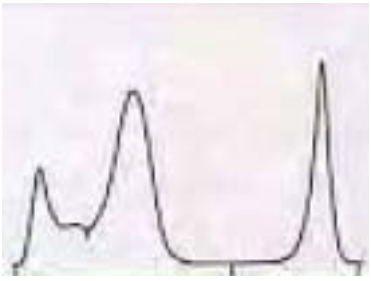
電気泳動での結果はアクリルアミド電気泳動のミットバンドの有無で主に判断した。



アガロース電気泳動　　アクリルアミド電気泳動

ａ．正常ボランティア血清





アガロース電気泳動　　アクリルアミド電気泳動

ｂ．プール血清 No.9

図１　血清　電気泳動パターン

４‐２‐２　新鮮ヒトプール血清の安定性（表２、図２）

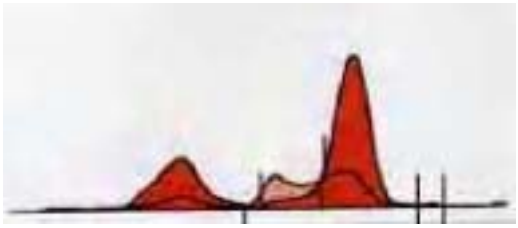
-20 ℃、-70 ℃保存での安定性について検討した結果、生化学項目およびアポ蛋白で明らかに変動が観られた項目は-20 ℃保存での ALT の低下のみであった（表２）。濁度に関しては、-20 ℃保存品で一部の試料で上昇が見られた。HDL-C、LDL-C については、-20 ℃保存品での変動が大きく 6 ヶ月間保存後では最大で HDL-C では 6.8 mg/dL、LDL-C で 14 mg/dL の変動が観られた。尚、電気泳動パターンでも微妙であるが変化した試料も観られたが（プール血清 No.1 -20 ℃保存、図２）、必ずしも HDL-C、LDL-C の測定値の変動幅が大きい試料ほど泳動パターンに変化が観られたわけではなかった。

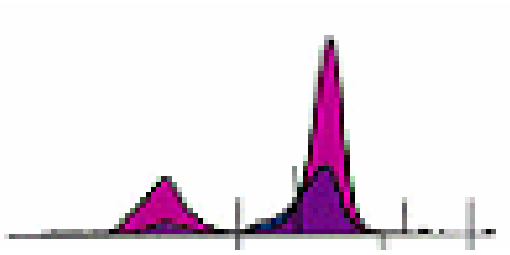
表２　新鮮ヒトプール血清の安定性

（表中の単位：mg/dL）

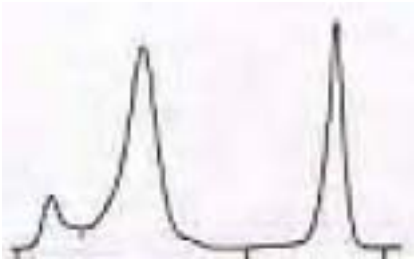
			プール血清 No.									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HDL-C	-20 ℃	２週間後	51.8	51.0	71.5	68.6	53.7	59.8	62.5	58.1	54.2	57.7
		６ヶ月後	45.0	45.1	66.9	64.3	52.0	58.1	61.6	57.5	52.9	56.0
		変動	-6.8	-5.9	-4.6	-4.3	-1.7	-1.7	-0.9	-0.6	-1.3	-1.7
	-70 ℃	２週間後	52.8	52.0	71.7	68.7	53.7	59.6	63.1	58.2	54.1	57.7
		６ヶ月後	52.1	51.4	70.7	67.8	53.3	59.2	62.1	57.0	53.6	57.2
		変動	-0.7	-0.6	-1.0	-0.9	-0.4	-0.4	-1.0	-1.2	-0.5	-0.5
LDL-C	-20 ℃	２週間後	105	111	108	126	123	105	101	126	142	103
		６ヶ月後	98	109	103	123	120	91	102	128	141	99
		変動	-7	-2	-5	-3	-3	-14	1	2	-1	-4
	-70 ℃	２週間後	106	116	108	126	124	106	102	128	140	103
		６ヶ月後	106	117	109	127	125	107	104	127	142	103
		変動	0	1	1	1	1	1	2	-1	2	0

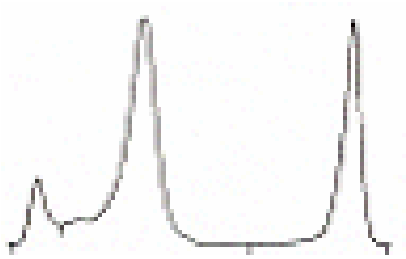
アガロース電気泳動





アクリルアミド電気泳動

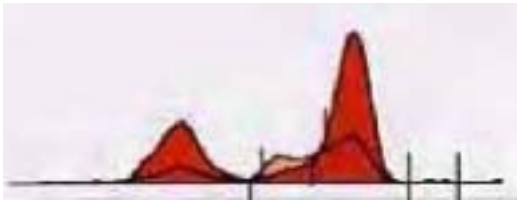


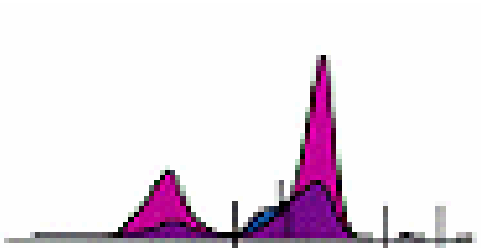


-70 ℃保存 2 週間　　-20 ℃保存 6 ヶ月

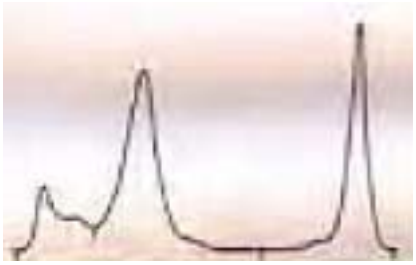
a．プール血清 No.1

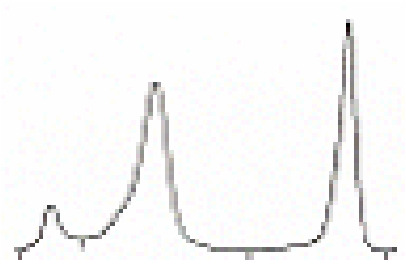
アガロース電気泳動





アクリルアミド電気泳動





-70 ℃保存 2 週間　　-20 ℃保存 6 ヶ月

b．プール血清 No.6

図２　プール血清　電気泳動パターン

４-２-３　収束性の検討結果（図３～８、表３）

新鮮ヒト血清を用いて作製した 10 種類のプール血清試料を用いて、直接法試薬での収束性の効果について検討した。収束性はその都度新鮮な血清 10 検体も同時に測定し、候補品による補正によって収束する程度で評価した。

４-２-３-１　　HDL-C

図３にプール血清作製後-70 ℃、６ヶ月保存後の収束性の結果を示した。2006 年度に検討した NCCLS（C37A）に基づいて作製した試料（作製後-70 ℃保存で 1 年以上経過しているので直接は比較できない。1S～6SJ）も含めて示した。NCCLS（C37A）に基づいて作製した試料においては 2006 年度の検討結果よりさらに収束性が劣る結果となり、保存による影響が考えられた。一方、今回の検討に供した試料においても、収束性には差がみられ、特に作製直後にすでに電気泳動パターンが異常であった No.9 およびプール血清作製時にボランテイア検体の一部に多少異常パターンが観られたプール血清 No.2, 8 で収束性が劣っていた。その他のプール血清においては、各社の標準操作法で測定した結果より収束性は向上した。

また、参考データではあるが、-20 ℃保存品においては（図４）、ほぼ全ての試料で収束性は劣化する傾向であったが、必ずしも-70 ℃保存品での結果の傾向とは一致せず、一部違いも観られた。

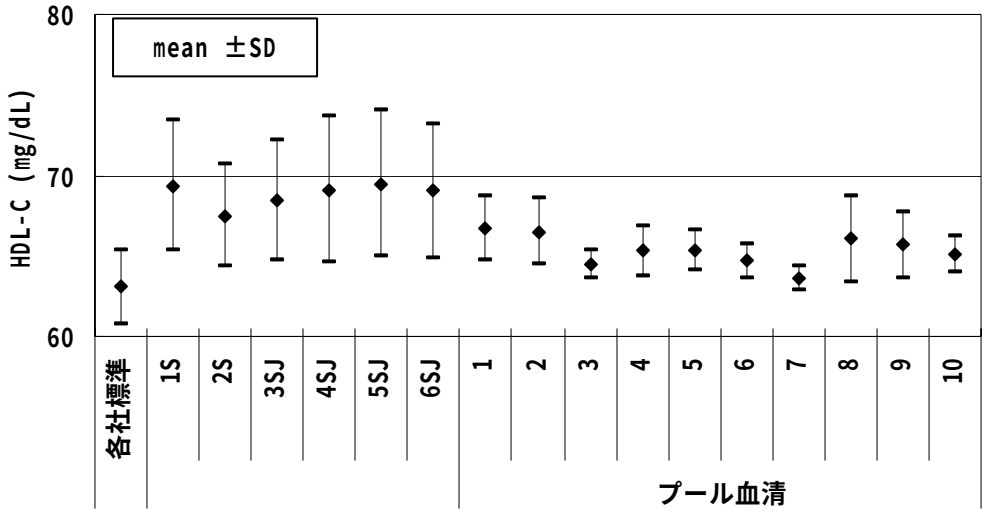


図３　HDL-C -70 ℃ ６ヶ月保存後の収束性

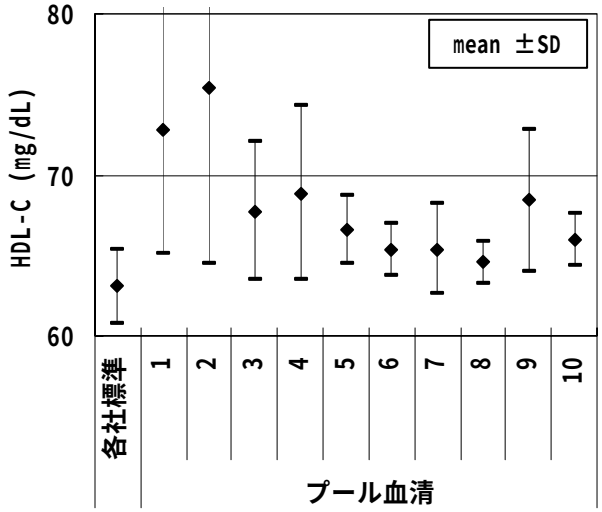


図４　HDL-C -20 ℃ ６ヶ月保存後の収束性

今回の検討はプール血清作製後、約 2 週間、約 4 ヶ月および約 6 ヶ月後に検討を行ったが、その際に用いた新鮮ヒト血清 10 検体はそれぞれ異なるので、各社の標準的操作法での収束性と本プール血清使用での収束性（CV%）の推移を図 5 に示した。

3 回の検討で、各社の標準的操作法およびプール血清-70 ℃保存品での収束性はほぼ一定であるが、プール血清-20 ℃保存品では、保存期間が長いほど収束性が劣化する傾向が観られた。

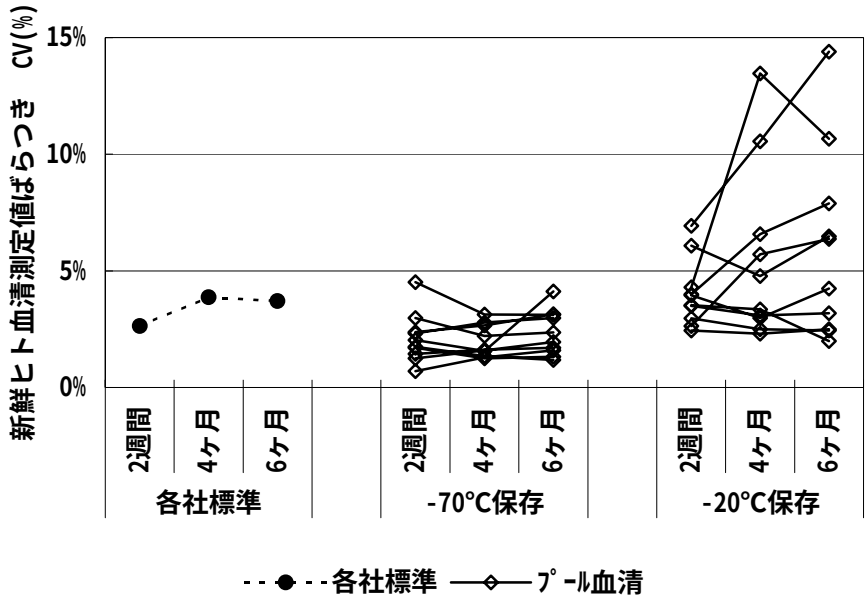


図５　HDL-C 新鮮ヒト血清測定値収束性の推移

４－２－３－２　　LDL-C

図６にプール血清作製後-70 ℃、６ヶ月保存後の収束性の結果を示した。2006 年度に検討した NCCLS（C37A）に基づいて作製した試料（作製後-70 ℃保存で 1 年以上経過しているので直接は比較できない。1S～6SJ）も含めて示した。NCCLS（C37A）に基づいて作製した試料においては 2006 年度の検討結果よりさらに収束性が劣る結果となり、保存による影響が考えられた。一方、今回の検討に供した試料においても、収束性には差がみられたが、HDL-C よりは各試料による収束性の差は観られなかった。

また、参考データではあるが-20 ℃保存品においては（図７）、ほぼ全ての試料で収束性は劣化する傾向であったが、HDL-C での傾向とは異なっていた。

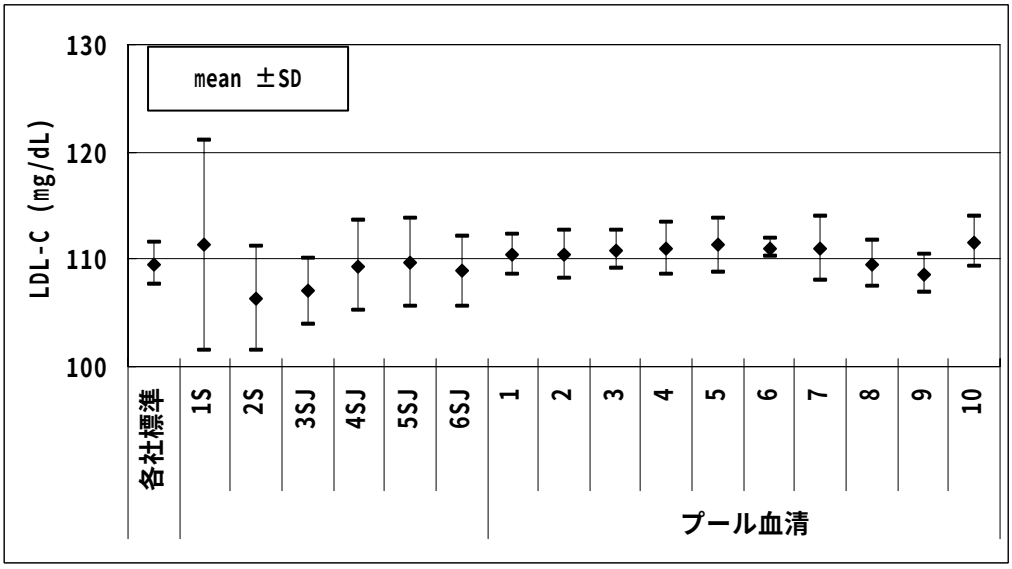


図６　LDL-C -70 ℃ ６ヶ月保存後の収束性

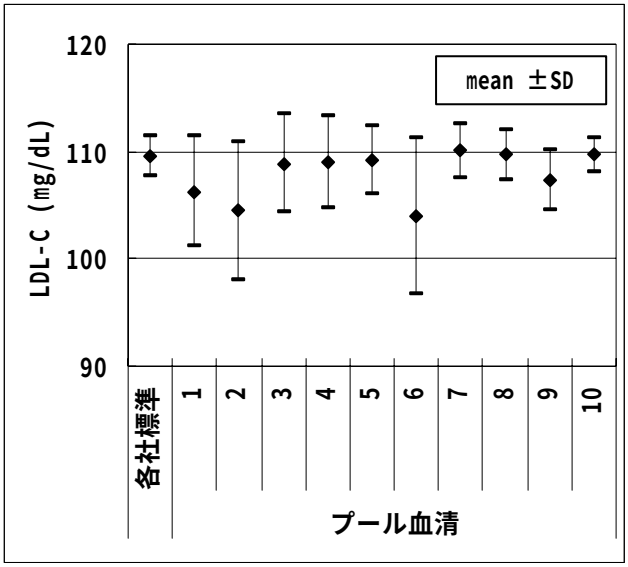


図７　LDL-C　-20 ℃ ６ヶ月保存後の収束性

今回の検討はプール血清作製後、約 2 週間、約 4 ヶ月および約 6 ヶ月後に検討を行ったが、その際に用いた新鮮ヒト血清 10 検体はそれぞれ異なるので、各社の標準的操作法での収束性と本プール血清使用での収束性（CV %）の推移を図８に示した。

3 回の検討で、各社の標準的操作法およびプール血清-70 ℃保存品での収束性はほぼ一定であるが、プール血清-20 ℃保存品では、HDL-C 同様保存期間が長いほど収束性が劣化する傾向が観られた。

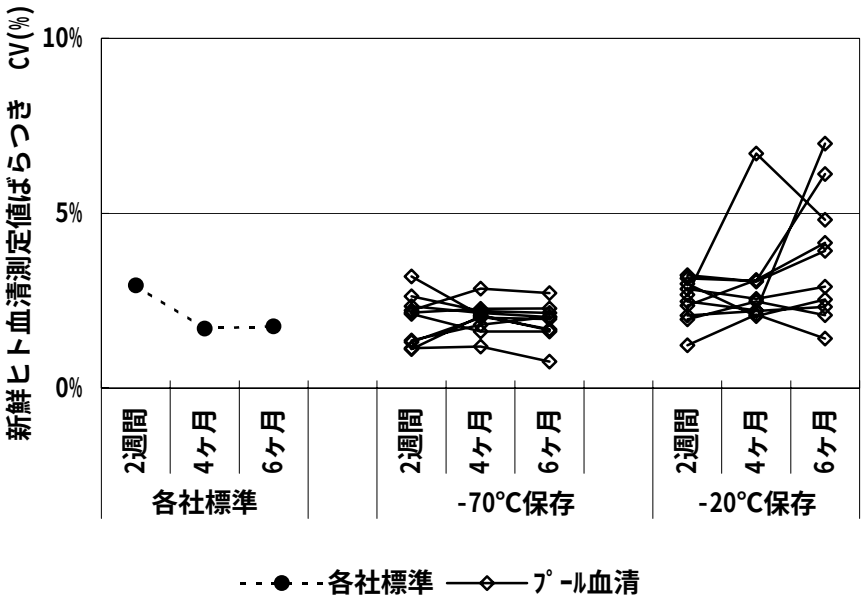


図８　LDL-C 新鮮ヒト血清測定値収束性の推移

４-２-３-３　評価結果

以上の結果を表３に纏めた。

これらの検討結果から、本検討のプロトコルに従い、新鮮で少なくとも電気泳動上異常がない血清を選択してプールし、保存条件を規定することにより、少なくとも 6 ヶ月間は使用可能な実試料標準物質の作製の可能性が示唆された。

表３　新鮮ヒトプール血清の評価結果（-70 ℃保存）

		収束性	安定性		電気泳動パターン	総合評価
			HDL-C/LDL-C	他項目		
プール血清	1	△	○	○	○	○
	2	△	○	○	△	○
	3	○	○	○	○	◎
	4	△	○	○	○	○
	5	△	○	○	○	○
	6	○	○	○	○	◎
	7	△	○	○	○	○
	8	×	○	○	△	×
	9	×	○	○	×	×
	10	△	○	○	○	○

５．実試料標準物質の作製プロトコル

上記の報告を基に、実試料標準物質の作製プロトコル（案）を設定した。

５-１　トレーサビリティ連鎖（図９）

今回作製した実試料標準物質候補品は、上記の結果より採血直後の新鮮ヒト血清に近い性状を有しており、直接法試薬による反応性の差もないため SI 単位系を最上位に位置付け、基準的な分

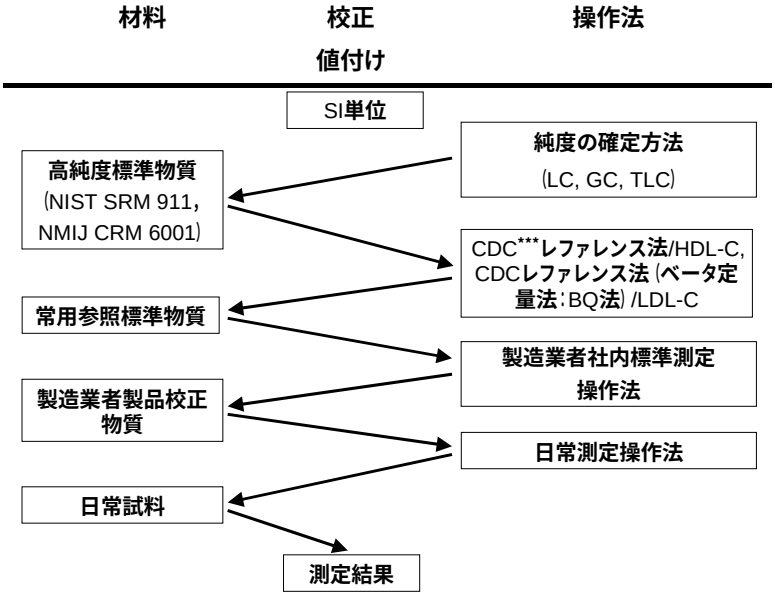


図９　HDL-C、LDL-C 測定のトレーサビリティ連鎖図

析法を CDC 基準測定法（HDL-C：UCMH または DCM、LDL-C：BQ）とした。

直接法の全ての試薬は CDC の認証試験を受け、CDC の値との整合性がとれているので、本候補品もその性状等が維持できる品質が要求されると考えている。が、検証については今後の課題である。

５‐２　試料の作製方法

採血後、個々の血清を遠心分離して採取した後に一定量プールし、プレフィルターでろ過する。ろ過後セラムチューブに 0.5 mL 分注し、-70 ℃で凍結保存する。尚、採血から保存までは当日中に行う。

５‐３　試料の性状規格（案）（表４）

生化学項目（AST、ALT、TP、ALB、UA、TG、TC）、アポ蛋白、濁度、および HDL-C、LDL-C の許容濃度範囲および電気泳動パターン（アガロース電気泳動、アクリルアミド電気泳動）から性状規格（案）を設定した。

なお、プールする前の個々の血清についても同様な規格が望ましい。

表４　試料の性状規格（案）

	許容濃度範囲			単位
AST		40 以下		U/L
ALT		40 以下		U/L
TG		120 以下		mg/dL
TC	150	～	210	mg/dL
UA	4.0	～	6.0	mg/dL
TP	6.5	～	7.5	g/dL
ALB	3.7	～	4.7	g/dL
T-Bil		1.0 以下		mg/dL
D-Bil		0.5 以下		mg/dL
Apo AⅠ	100	～	170	mg/dL
Apo AⅡ	20	～	40	mg/dL
Apo B	60	～	120	mg/dL
Apo CⅡ	1.0	～	5.0	mg/dL
Apo CⅢ	5.0	～	10.0	mg/dL
Apo E		5.0 以下		mg/dL
HDL-C	45	～	75	mg/dL
LDL-C	100	～	130	mg/dL
Abs.	0.6 以下（測定波長660nm）			
電気泳動パターン	アガロース	新鮮な正常血清パターン		
	アクリルアミド	新鮮な正常血清パターン		

５-４　値付けの方法

基本的には CDC のネットワークである Cholesterol Reference Method Laboratory Network（CRMLN）数か所での共同実験または CDC での値付けが望ましいが、上記試料については継承性、安定性も含めて解決すべき課題が残っているので、それらを解決した後に設定する。

６．今後の課題

平成 19 年度の研究は、新鮮な血清からプール血清を作製し、それを用いての収束性の効果を検証し、効果が観られた試料と効果が観られなかった試料との差異を検討し、暫定ではあるが、本目的に合致した実試料標準物質候補品の性状規格（案）と試料調製方法（案）を設定した。平成 18 年度までは、メーカーのキャリブレータ、コントロールおよび米国から輸入した凍結血清を用いて NCCLS（C-37A）に基づいて作製した試料について検討したが、それらの試料においては直接法試薬の測定原理に起因する反応性の差、および試料の保存安定性等による課題が明らかになった。今回設定した試料においては、上記課題である反応性の面で有意に改善できているが、

試料作製にはボランティア血清が必要なこと、採血から小分け保存までを当日中にしなければならない等の制約により作製する量が限定されるために、一般の施設がトレーサビリティの確認等に使用できる試料の作製方法にまでは至っていない。本課題については試料作製のための血清の入手の方法を見直さない限り永遠の課題として残る。また、本 HDL-C、LDL-C 以外にも標準化のための実試料標準物質の作製、検討が行われており、何れの項目においても目的に合致した血清を安定して入手する方法が確立されない限り継承性の課題は解決されないので、その整備を先ず行うことが、実試料標準物質の作製においては必要絶対条件と考える。

７．結び

平成 17 年度から 3 年間の検討は決して順調ではなかったが、種々検討する中で最も目的に合致した試料として、当然ではあるが新鮮な血清を選択し検討を行った。本年度の研究では暫定ではあるが性状規格（案）の設定までは進めたが、実試料標準物質の作製までは至らなかった。今後これらの知見を参考にして関係者全てが納得する実試料標準物質の作製が実現することを期待する。

2-2-3-9　測定用常用参照および実用血清標準物質（アルブミン）

要旨

1）ヒト血清アルブミンから高純度に分離精製した単量体アルブミンを原料にして試作された2種類の臨床検査用アルブミン標準物質（常用参照標準物質、血清用実用用標準物質）を用いて、市販測定キットの測定特性を検討した。

2）常用参照標準物質については、その下位に位置する血清用実用標準物質から試薬校正物質（市販キット添付校正物質）への値のトランスファーラビリティを確認することができた。

3）今回作製した常用参照標準物質および血清実用標準物質を用いたトレーサビリティ連鎖が成立しない原因が日常検査法のアルブミンに対する反応特異性に起因することが確認できた。

4）改良 BCP 法はアルブミン特異性の高く、本法を採用すればトレーサビリティ連鎖確保の可能性が示唆された。

5）一次基準測定法にはアルブミン水解アミノ酸の同位体希釈質量分析法、常用基準測定法にはHPLC-BCG 法によるトレーサビリティ連鎖を構築する可能性を確認した。

1．目的

アルブミンの測定はアルブミンと色素との結合による色調の変化（メタクロマジー）を利用してアルブミン濃度を測定する色素法や抗原抗体反応を利用した免疫法がある。色素としてはHABCA, BCG, BCP などが用いられるが、HABCA はビリルビンや薬剤の影響を受け、BCG 法はグロブリンと反応するため、グロブリンの濃度の影響を受ける。

一方、BCP 法はグロブリンの影響は受けないが、酸化型および還元型アルブミンとは色調に差がある。そのため、各種測定法間の互換性を確保するためには、それぞれの測定値を補正するための標準物質が必須である。これら標準物質を確定し、一次基準測定法および常用基準測定法を設定し、血清アルブミン測定値のトレーサビリティ連鎖による測定体系を確立することを目的とする。

2．委員会の構成

氏　　名	所　　属
委員長　大澤　進	九州大学医学部保健学科
委　員　村本良三	心臓血管研究所付属病院検査部
大竹和子	慶応義塾大学医学部中央臨床検査部
渡津吉史	ダイアシス（株）
岸　浩司	シスメックス（株）
山本茂一	（株）カイノス
花田寿郎	和光純薬工業（株）
斉藤憲祐	デイドベーリング（株）

高笠信之	関東化学（株）
田中龍彦	（株）シノテスト
桑原正英	第一化学薬品（株）

３．委員会の開催

日本臨床化学会の学会開催時と必要に応じて e-mail による協議を行った。

４．標準物質の設定概要

４-１実験計画書

図１に示すようにアルブミンの標準物質は「高純度標準物質」「常用参照標準物質」「実用標準物質」を設定することにしている。そして、それぞれの概要は下記の通りである。

なお、これら標準品の品質規格は平成 17 年度報告書に記載した。

・高純度標準物質：ヒト血清アルブミン（リコンビナントヒト血清アルブミンも対象とする）よりほぼ純品に精製したもので、SI 単位に繋げるための標準品（一次標準物質）。本品の作製には困難を伴うので今後の課題とする。

・常用参照標準物質：ヒト血清アルブミンより単量体アルブミンのみを 98 %以上に精製したもので、糖などの安定化剤を添加し、凍結乾燥した標準品（二次標準物質）。

・実用標準物質：本クラスの標準物質は次の２種類を作製する。

① ヒト血清アルブミン実用標準物質：ヒト血清中のアルブミン測定に用いるもので、アルブミン濃度は 3 g/dL 程度とする。

② ヒト尿アルブミン実用標準物質：ヒト尿中のアルブミン測定に用いるもので、アルブミン濃度は 30 mg/dL 程度とする。

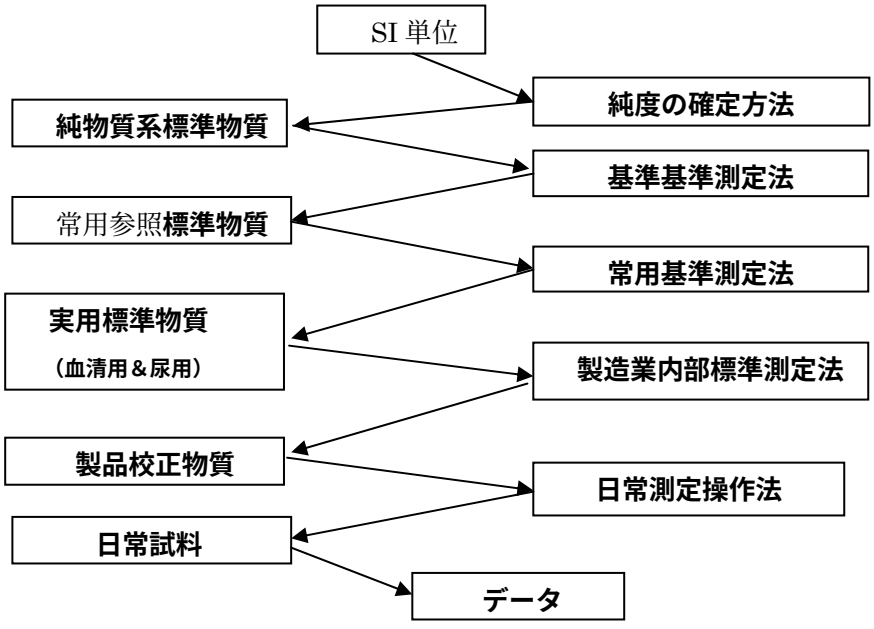


図１　血清アルブミン測定のトレーサビリティ連鎖

4－2共同実験

4－2－1測定試料

①ヒトアルブミン凍結乾燥品（純度97～99 %）3種類

②ヒトアルブミン30 %アルブミン水溶液1種類

③ヒトアルブミン分画Ⅴ 2種類

④高純度ヒトアルブミン2種類

⑤CRM470

⑥実用標準物質

4－2－2測定方法

①改良BCP法

②BCP法

③BCG法

④免役比濁法

4－2－3測定結果

今回開発したヒトアルブミン実用標準物質の補正効果について、患者プール血清3種類を用いて17種類の日常検査試薬（BCP法5種、BCG法9種類、ドライケミストリー；BCG法2種類、ラテックス免疫比濁法1種類）について実施した（表1）。その結果、補正前およびCRM470による補正とはよく一致し、変動係数CV値がそれぞれ2.2～6.5 %、2.1～6.7 %であるのに対して実用標準物質による補正はCV値9.2～12.9 %となり方法間の測定値ばらつきが拡大した。ドライケミストリーは試料の組成（マトリックス）により影響が指摘されており、これを除外して補正効果を見ると、CV 7.1～11.7 %と改善がみられるが、補正前よりは方法間のばらつきが大きい結果で、ばらつきの原因がマトリックスの問題のみでないことが確認できた。

また、図2にはCRM470補正値と実用標準物質補正値の相関を示したが、市販の測定試薬を用いた場合、実用標準物質補正値の方が低値を示し、両者の間にはY切片があり、両方間にはコミュータビリティが取れないことが判明した。

この原因を検証するために、アルブミンに対して特異性の高い免疫測定法（ネフェロメトリー法）とBCG法、BCP法およびBCP改良法との相関を調べた（図3）。その結果、BCG法は免疫測定法に対してY切片を有し、高値示し、明らかにアルブミン以外の物質を計り込んでいることが確認された。現在、世界的に蛋白質の標準物質として多用されているCRM470はヒト血清をマトリックスとしており、アルブミン以外にも多くの血清蛋白を含有しているので、免疫法以外の方法で測定する場合のアルブミンの実用標準物質にはなり得ないことが示唆された。

表１　実用標準物質および CRM470（国際蛋白標準物質）による補正効果

	補正前		実用標準物質補正				CRM470 補正	
測定試料名	全体	ドライ除外	全体	ドライ除外	BCP 法	BCG 法	全体	ドライ除外
常用参照標準物質	10.8	6.1	0.1	0.1	0.0	0.0	10.8	6.4
実用標準物質	10.6	6.1	1.4	2.6	1.8	3.1	10.5	6.4
CRM 470	1.8	1.8	8.4	6.6	6.8	5.5	0.4	0.2
患者血清-低濃度	6.5	6.8	12.9	11.7	3.9	7.5	6.7	7.0
患者血清-中濃度	3.2	3.3	10.4	8.7	5.3	6.1	3.3	3.5
患者血清-高濃度	2.2	2.2	9.2	7.1	5.9	6.2	2.1	1.8

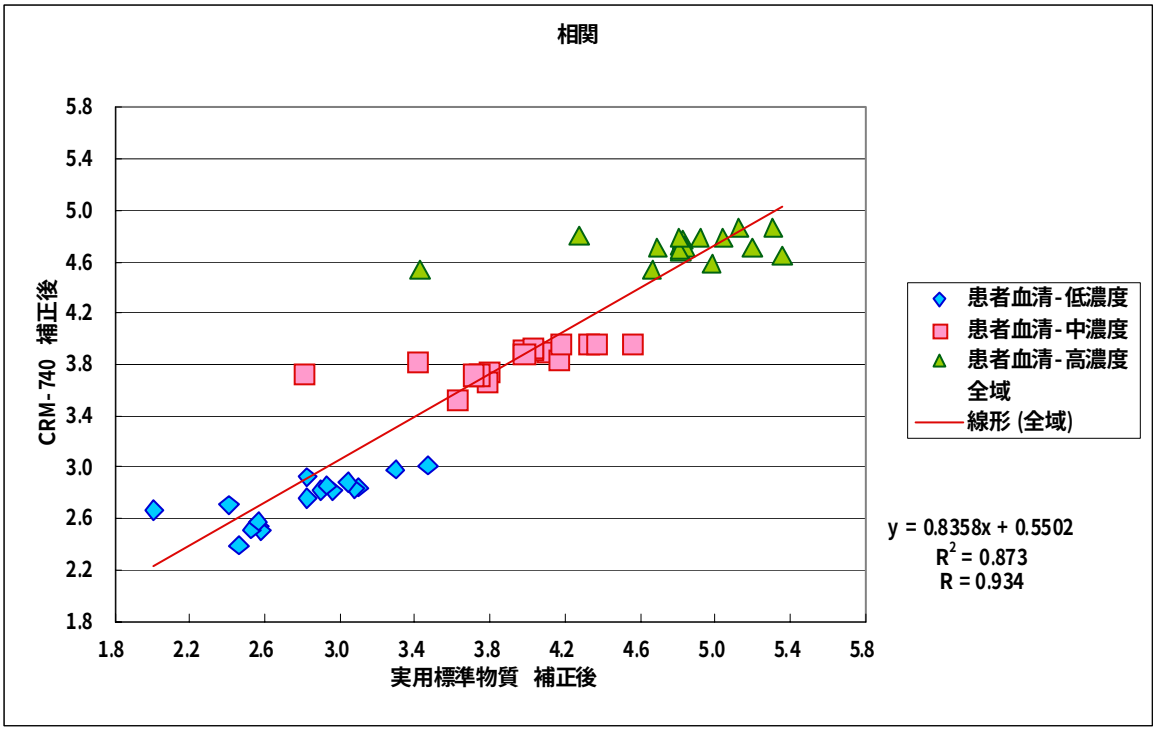


図２　CRM470および実用標準物質による補正後の測定値の相関

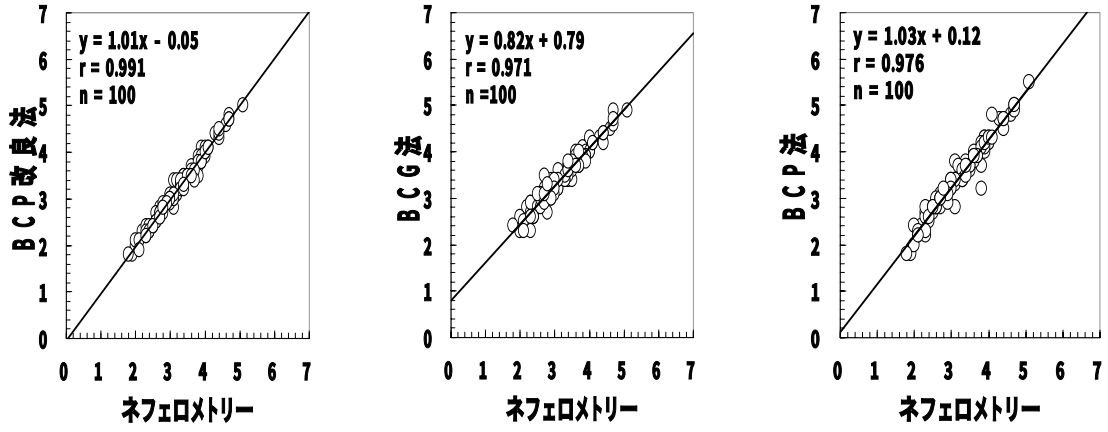


図３ 免疫測定法と各種測定法との相関

日常検査法で利用されている色素法では、利用する色素により血清蛋白に対する反応性が異なることが知られており、どの方法にも正確さを伝達させ、かつ反応互換性を持たせることは難しい。とくに日常的に使用されている血清アルブミン測定試薬はアルブミンに対する反応特異性は完璧ではなく、便宜上、見かけ上の値を求めているにすぎないため、校正用標準物質は各社で異なり、共用出来ないのが現状である。

また、BCG法とBCP法とではコミュータビリティが取れていない。結果的に、今回設定した実用標準物質日常法に使用出来る可能性があるのは新BCP法のみであった。その結果、現在多用されている市販試薬を用いる限り、標準物質の開発のみではトレーサビリティ連鎖の確立は非常に困難である。

５．実試料標準物質の作製プロトコル

18 年度の研究の結果、市販の血清アルブミン測定試薬は血清中のアルブミン以外にグロブリンなどの蛋白質を測り込み、アルブミンに対する特異性に問題があった。そのために血清のようなアルブミン以外の蛋白質を含有する検体においてアルブミンのみを測定し、上位の標準物質にトレーサビリテティある特異性の高い測定法の開発が重要になった。そのため、液体クロマトグラフィでアルブミンのみを分離し、測定する常用基準測定法を開発した(図１)。

５-１トレーサビリティ連鎖

臨床検査における血清アルブミン測定のトレーサビリティ連鎖図に示した体系にする(図１)。すなわち、最高位の高純度物質→常用参照標準物質→実用標準物質→検量用校正物質（日常検査キット添付キャリブレータ）間において上位から下位への伝達性（transferability）と下位から上位への遡及性（traceability）を確保することに用いる。一次基準測定操作法にはアルブミン水解後のアミノ酸同位体希釈質量分析法、常用基準測定法には HPLC-BCG 法によるトレーサビリティ連鎖を確立した。特にヒト血清アルブミンのみからなる常用参照標準物質や実用標準物質から

検量用校正物質や日常検体などのヒト血清を含有する物質への伝達性、遡及性は常用基準測定法

を介して行われる体系とした。

５-２　基準測定法の候補測定法

1.　一次基準測定法

一次基準測定法についての候補測定法の概要を述べるが、最終的には臨床化学会などで勧告される必要がある。

1）測定原理

アルブミンの塩酸加水分解物であるアミノ酸（バリン、ロイシン、リジンの 3 種）を液体クロマトグラフ同位体希釈質量分析法（ID-LC/MS）で測定して、アルブミン量を求める。

２）測定試料

・ヒトアルブミン常用参照物質候補品（Lot No.20050422SKW、凍結乾燥品ガラスバイアル入，冷蔵、純水１ mL で溶解したアルブミン濃度目標値：3.0±0.5　g/dL）1 本のボトルに正確に水 1.000 ±0.002 mL を加えて溶解したものを測定に供した。

（溶解後の組成表示：100mM りん酸 Na バッファー，150 mM NaCl，0.05 % NaN_3）

3）測定方法の概要

図４に示すように、測定試料に 3 種のアミノ酸（バリン、ロイシン、リジン）のそれぞれの安定同位体を内部標準としてスパイクして十分に混和後、110 ℃の熱塩酸中で 72 時間かけてアルブミンを構成するアミノ酸を完全に加水分解する。遊離した 3 種のアミノ酸の自然界主同位体とスパイクしたそれらの安定同位体、それぞれの$[M+H]^+$ イオンのピーク面積を、逆相高速液体クロマトグラフ・質量分析計（エレクトロスプレーイオン化法）により測定する。3 種のアミノ酸の高純度試薬（それぞれの純度は約 99 %）を混合した標準液について同様に$[M+H]^+$ イオンのピーク面積を測定して、各アミノ酸の同位体のモル比(x) とピーク面積比(y)との検量線を作成する。この検量線を基に遊離したアミノ酸の量を求め、アルブミン分子中の各アミノ酸残基の個数で除してアルブミンを定量する。

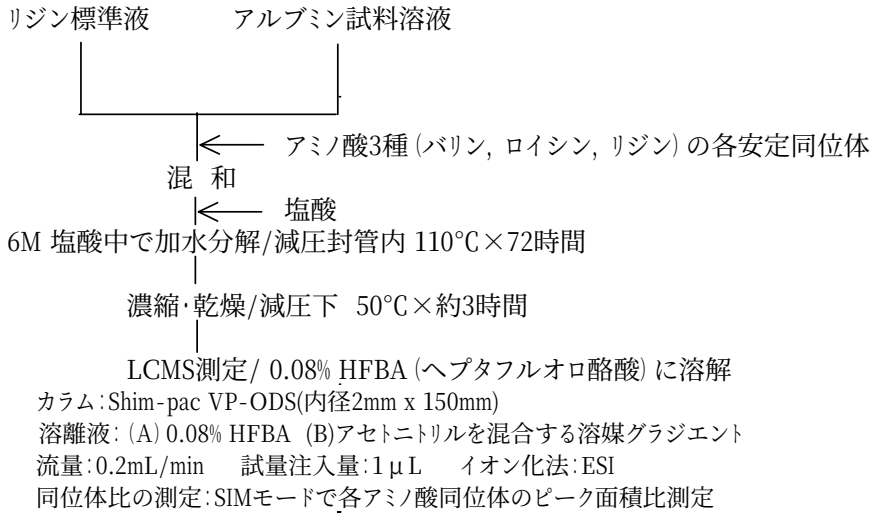


図4 ID-LC/MS によるアルブミン測定操作手順

4）測定結果

本法によりヒトアルブミン常用参照標準物質候補品と NIST SRM 927d、それぞれ 2 バイアルを各々3 回ずつ測定した結果を表２に示した。バリン、ロイシン、リジンの 3 種のアミノ酸から求め他アルブミン濃度の測定精度は、いずれも CV 02 % 〜 0.7 %で良好である。

測定したアルブミン濃度の総平均値とこれら 3 種のアミノ酸を測定して求めたそれぞれの平均値は、いずれも±1 % 以内で良く一致している。また、調整濃度目標値 3.0±0.5 g/dL の中心値とも一致している。

これらの結果より、SI 単位に直結する本 ID-LC/MS 法をアルブミンの基準測定操作法として適用できる可能性が高いと考えられる。

表２ ID-LC/MS 法によるヒト血清アルブミン標準物質候補品の測定結果

測定アミノ酸（ヒトアルブミン中の個数）	ヒトアルブミン濃度測定値 g/dL			
	バイアル 1	バイアル 2	平均値	総平均値
バリン（41）	3.003	3.012	3.014 (CV 0.47 %)	3.027 (CV 0.54 %)
	3.001	3.044		
	3.010	3.016		
ロイシン（61）	3.031	3.045	3.035 (CV 0.50 %)	
	3.019	3.016		
	3.041	3.060		
リジン	3.026	3.021	3.031	

(59)	3.047	3.022	(CV 0.36 %)	
	3.027	3.047		

注：計算に用いたヒトアルブミンの分子量：MW 66,596

２．常用基準測定法

常用基準測定法の詳細は次項２－２－３－１０に記載したが、測定精度、再現性、不確かさにおいて常用基準測定法としての機能を備えていることが確認出来た。

５－３試料の性状規格

常用参照標準物質、血清アルブミン実用標準物質のプロトタイプ、各 100 バイアル作製した。そして、これらの規格を確認した。すべて規格を満たしていた（表３～５）。

表３　アルブミン常用参照標準物質の規格

項　　目	規　　格	確　認　値
１　適用範囲	本品はﾋﾄの尿中および血清中アルブミンを測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２　原料		
2-1 起源	ヒト血清を起源とする。	ヒト血清／適合
2-2 基材	ヒト血清アルブミン	ヒト血清アルブミン／適合
2-3 添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4 感染物質	本品は、原料であるヒト血液の HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および 2 抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。	HBｓ抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および２抗体の検査を行い、陰性の結果を得た。／適合
	注意)感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。	
３　特性		
3-1 形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品／適合
3-2 包装	ガラスバイアル、1 mL(使用時)の単品	規格に従う／適合
3-3 反応性	ヒト血清と同様な挙動を示す。	反応性試験実施中
3-4 物理学的性質		
3-4-1 分子量	SDS-PAGE で 67 kDa である。	SDS-PAGE で 67 kDa であった。／適合
3-4-2 純度	HPLC 分析で 98 %以上。	100 %の純度を示した。／適合
3-5 安定性		
3-5-1 開封前の安定性	1) 有効期間:5 年(-20 ℃以下冷蔵)を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。	保存安定性試験実施中
	2) 有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は 98 %以上である。	保存安定性試験実施中

3-5-2 開封後の安定性	10 ℃以下の保管で 8 時間使用できる	10 ℃以下および 25 ℃保存で少なくとも溶解後 25 時間は使用可能であった。／適合
3-6 均一性	1) 10 バイアルの 3 回反復測定を行いバイアル間差は±3 %以内とする。 2) 不確かさを表記する	バイアル間差は CV = 0.77 %（n=10 vial）であった。／適合 （株）カイノスキットによる測定を行った結果、±0.05 g/dL であった。／適合
4　アルブミン濃度	使用時に 3.0±0.5 g/dL とする。	（株）カイノスキットによる測定を行った結果、ALB は 3.35mg/dL であった。／適合

表４　血清アルブミン実用標準物質の規格

項目	規格	確認値
１　適用範囲	本品はヒト血清中アルブミンを測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２　原料		
2-1 起源	ヒト血清を起源とする。	ヒト血清／適合
2-2 基材	ヒト血清アルブミン	ヒト血清アルブミン／適合
2-3 添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4 感染物質	本品は、原料であるヒト血液の HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および 2 抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。	HBｓ抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および２抗体の検査を行い、陰性の結果を得た。／適合
	注意)感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。	
３　特性		
3-1 形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品／適合
3-2 包装	ガラスバイアル、1 mL(使用時)の単品	規格に従う／適合
3-3 反応性	ヒト血清と同様な挙動を示す。	反応性試験実施中
3-4 物理学的性質		
3-4-1 分子量	SDS-PAGE で 67 kDa である。	SDS-PAGE で 67 kDa であった。／適合
3-4-2 純度	HPLC 分析で 95 %以上。	100 %の純度を示した。／適合
3-5 安定性		
3-5-1 開封前の安定性	1) 有効期間:5 年(10 ℃以下冷蔵)を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。	保存安定性試験実施中
	2) 有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は 95 %以上である。	保存安定性試験実施中
3-5-2 開封後の安定性	10 ℃以下の保管で 8 時間使用できる	10 ℃以下および 25 ℃保存で少なくとも溶解後 25 時間は使用可能であった。／適合
3-6 均一性	1) 10 バイアルの 3 回反復測定を行いバイアル間差は±3%以内とする。 2) 不確かさを表記する	バイアル間差は CV = 0.77%（n=10 vial）であった。／適合 （株）カイノスキットによる測定を行った結果、±0.05 g/dL であった。／適合
４　アルブミン濃度	使用時に 3.0±0.5 g/dL とする。	（株）カイノスキットによる測定を行った結果、ALB は 3.35 mg/dL であった。／適合

表５　尿アルブミン常用参照標準物質の規格

項目	規格	確認値
１　適用範囲	本品はヒトの尿中および血清中アルブミンを測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２　原料		
2-1 起源	ヒト血清を起源とする。	ヒト血清／適合
2-2 基材	ヒト血清アルブミン	ヒト血清アルブミン／適合
2-3 添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4 感染物質	本品は、原料であるヒト血液の HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および 2 抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。	HBｓ抗原、HCV 抗体、HIV-1 抗体および２抗体の検査を行い、陰性の結果を得た。／適合
	注意)感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。	
３　特性		
3-1 形状	凍結乾燥品	白色固形の凍結乾燥品／適合
3-2 包装	ガラスバイアル、1 mL(使用時)の単品	規格に従う／適合
3-3 反応性	ヒト血清と同様な挙動を示す。	反応性試験実施中
3-4 物理学的性質		
3-4-1 分子量	SDS-PAGE で 67 kDa である。	SDS-PAGE で 67 kDa であった。／適合
3-4-2 純度	HPLC 分析で 95 %以上。	100%の純度を示した。／適合
3-5 安定性		
3-5-1 開封前の安定性	1) 有効期間:5 年(10℃以下冷蔵)を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。	保存安定性試験実施中
	2) 有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は 95%以上である。	保存安定性試験実施中
3-5-2 開封後の安定性	10 ℃以下の保管で 8 時間使用できる	10 ℃以下および 25 ℃保存で少なくとも溶解後 25 時間は使用可能であった。/適合
3-6 均一性	1) 10 バイアルの 3 回反復測定を行いバイアル間差は±3 %以内とする。	バイアル間差は CV = 0.77 %（n=10 vial）であった。／適合
	2) 不確かさを表記する	シスメックス社キットによる測定を行った結果、±2.73mg/dL であった。／適合
４　アルブミン濃度	使用時に 300±50 mg/dL とする。	シスメックス社キットによる測定を行った結果、ALB は 293.7mg/dL であった。／適合

５-３値付けの方法：常用参照標標準物質、血清アルブミン実用標準物質の暫定値付け

今回は常用参照標標準物と血清アルブミン実用標準物質は同じもので保存条件が異なるだけであるので、常用参照標標準物のみを値付けの対象として実施した。値付けに用いた測定試薬は測定原理として BCP 改良法はＡ社、BCG 法として、Ａ社、Ｂ社（株)、Ｃ社製 2 種の合計 5 種類の試薬で実施したが、BCG 法は原理的に問題があり、低値を示したので、ここでは BCP 法の結果を示した（表９～11)。

結果は濃度 3.35 g/dL、不確かさ 0.06 g/dL であった。なお、この結果を性能評価実験に用いた。

表９　アルブミン常用参照標準物質の値付け

【CRM470 校正による測定結果】

試薬	バイアル間差 (C.V)	同時再現性 (C.V)	平均値±不確かさ (g/dｌ)
Ａ社　ALB 試薬(改良 BCP)	0.71	0.80	3.34 ± 0.06
Ａ社　ALB 試薬(BCG)	0.80	0.81	3.03 ± 0.05
Ｂ社　ALB(BCG)	0.45	0.57	3.30 ± 0.05
Ｃ社 (BCG)	0.81	1.01	3.01 ± 0.05
Ｃ社　HR Ⅱ(BCG)	0.50	0.64	3.13 ± 0.06

参考　シスメックス測定結果 ： 3.28 ± 0.07 g/dｌ

各社標準液校正による測定結果

試薬	平均値±不確かさ（g/dｌ)
Ａ社　　ALB 試薬(改良 BCP)	3.31 ± 0.06
Ａ社　　ALB 試薬(BCG)	3.05 ± 0.05
Ｂ社　　クリニメイト ALB(BCG)	3.21 ± 0.05
Ｃ社　　HA テストワコー(BCG)	3.01 ± 0.05
Ｃ社　　HR Ⅱ(BCG)	3.11 ± 0.06

表10　試薬の同時再現性

測定回数	ｱｸｱｵｰﾄｶｲﾉｽ ALB試薬	ｶｲﾉｽｵｰﾄALB 試薬	第一化学 ｸﾘﾆﾒｲﾄALB	和光純薬 HAﾃｽﾄﾜｺｰ	和光純薬 HR Ⅱ
1	3.31	3.02	3.29	3.03	3.13
2	3.36	3.08	3.28	3.06	3.14
3	3.30	3.04	3.26	2.99	3.15
4	3.32	3.02	3.29	2.99	3.12
5	3.30	3.02	3.28	2.99	3.11
6	3.29	3.05	3.29	2.99	3.15
7	3.35	3.08	3.28	3.06	3.17
8	3.32	3.06	3.23	2.97	3.12
9	3.30	3.03	3.28	3.03	3.11
10	3.27	3.04	3.28	3.01	3.14
Ave.	3.31	3.04	3.28	3.01	3.13
S.D	0.0264	0.0246	0.0186	0.0304	0.0201
C.V (%)	0.80	0.81	0.57	1.01	0.64
Max	3.36	3.08	3.29	3.06	3.17
Min	3.27	3.02	3.23	2.97	3.11

表 11　ﾊﾞｲｱﾙ間差

Vial No.	ｱｸｱｵｰﾄｶｲﾉｽALB試薬（BCP)				ｶｲﾉｽｵｰﾄALB試薬（BCG)				第一化学　ｸﾘﾆﾒｲﾄALB				和光純薬　HAﾃｽﾄﾜｺｰ				和光純薬　自動分析装置用-HR Ⅱ			
	測定値 1	測定値 2	測定値 3	平均値	測定値 1	測定値 2	測定値 3	平均値	測定値 1	測定値 2	測定値 3	平均値	測定値 1	測定値 2	測定値 3	平均値	測定値 1	測定値 2	測定値 3	平均値
1	3.31	3.30	3.34	3.32	3.05	3.01	3.00	3.02	3.30	3.28	3.31	3.30	3.05	2.96	3.03	3.02	3.17	3.13	3.06	3.12
2	3.32	3.34	3.34	3.33	3.02	3.08	2.99	3.03	3.32	3.33	3.26	3.30	3.10	3.02	3.01	3.04	3.12	3.17	3.11	3.13
3	3.33	3.38	3.37	3.36	3.07	3.05	3.02	3.05	3.32	3.33	3.33	3.33	3.06	3.03	3.03	3.04	3.12	3.16	3.14	3.14
4	3.42	3.37	3.36	3.38	3.05	3.03	3.07	3.05	3.33	3.30	3.31	3.31	3.04	3.06	3.05	3.05	3.16	3.16	3.14	3.15
5	3.37	3.31	3.40	3.36	3.07	3.03	3.10	3.07	3.33	3.31	3.37	3.34	3.14	2.98	3.04	3.05	3.14	3.16	3.07	3.13
6	3.34	3.37	3.39	3.37	3.06	3.09	3.11	3.09	3.35	3.31	3.28	3.32	3.11	3.09	3.08	3.09	3.12	3.06	3.13	3.11
Ave.				3.35				3.05				3.32				3.05				3.13
S.D				0.0239				0.0245				0.0148				0.0246				0.0156
C.V (%)				0.71				0.80				0.45				0.81				0.50
Max				3.38				3.09				3.34				3.09				3.15
Min				3.32				3.02				3.30				3.02				3.11

5-3-1． 性能評価

今回作製した標準物質が常用参照標準物質あるいは血清実用標準物質としての性能に付き、各社製造の測定キットを用いて検討した。その報告を下記に示すが、結論としては次のとおり、考察する。

1） 常用参照標準物質は規格を満たしており、標準物質として十分な性能を備えていた。

2） 血清実用標準物質も規格は満たしていたが､測定原理上問題を抱えている BCG 法では各社、試薬組成および校正物質に工夫を加えており、血清では見かけ上それなりの値が得られるが免疫測定法とは明らかに乖離しており、BCG 法の測定法としての問題点が明らかになった。そのため、グロブリンなどの血清成分を含まない今回の血清実用標準物質を校正物質として用いた場合、測定値の収束性が損なわれる結果となった。アルブミンに特異性の高い改良 BCP 法においては高い収束性と免疫測定法との相関も良好であり、標準物質として十分な機能を示した。BCG 法のアルブミン特異性を改良しない限り、既述のトレーサビリティ連鎖は得られないことが判明した。

5-3-2． 結果

5-3-2-1．正確さの伝達性

実用標準物質および CRM470（国際蛋白標準物質）による補正効果を表 12 に示した。

表 12　実用標準物質および CRM470（国際蛋白標準物質）による補正効果

	補正前		実用標準物質補正				CRM470 補正	
測定試料名	全体	ドライ除外	全体	ドライ除外	BCP 法	BCG 法	全体	ドライ除外
常用対照標標準物質	10.8	6.1	0.1	0.1	0.0	0.0	10.8	6.4
実用標準物質	10.6	6.1	1.4	2.6	1.8	3.1	10.5	6.4
CRM 470	1.8	1.8	8.4	6.6	6.8	5.5	0.4	0.2
患者血清-低濃度	6.5	6.8	12.9	11.7	3.9	7.5	6.7	7.0
患者血清-中濃度	3.2	3.3	10.4	8.7	5.3	6.1	3.3	3.5
患者血清-高濃度	2.2	2.2	9.2	7.1	5.9	6.2	2.1	1.8

暫定対照法（改良 BCP 法）を含む 17 種類の日常検査試薬（BCP 法 5 種、BCG 法 9 種類、ドライケミストリー；BCG 法 2 種類、ラテックス免疫比濁法 1 種類）について、患者プール血清 3 種類の実用標準物質および CRM470(国際蛋白標準物質)による補正効果を調べた結果を図６に示した。

標準物質による患者プール血清値の補正効果は、補正前後でほぼ同等であったのは CRM470 で

あった。これは各試薬の検量物質がCRM470を基準物質として採用していると推察された。

実用標準物質による補正は、補正後が３濃度プール血清ともに変動係数（%）が2〜4倍大きな数値となり方法間の測定値のばらつきが拡大し、補正効果は見られなかった。

ドライケミストリーは試料の組成（粘性）により影響が指摘されており、これを除外して補正効果を見ると、CV 7.1〜11.7 %と改善がみられるが、補正前よりは方法間のばらつきが大きい。

５-３-２-２　反応互換性

常用参照標準物質および実用標準物質の日常検査試薬における反応挙動を調べるため、暫定対照法（改良BCP法）と日常検査試薬（占有率上位５試薬）での2法間での患者血清（100例以上）の相関分布内に実用標準物質が分布するかを相関分布の95%信頼区間で評価した。また、今回開発した両標準物質の測定値が患者分布の回帰方程式からの相対残差が 5%以内にあるかを評価した。

① 常用参照標準物質

メーカー名・測定法	相対残差（%）	95%信頼区間	総合評価
C社・BCP法	-12.9	×	×
D社・改良BCP法	1.1	○	○
B社・BCG法	-9.1	×	×
E社・BCG法	-15.4	×	×
F社・BCP法	6.3	×	×

② 実用標準物質

メーカー名・測定法	相対残差（%）	95%信頼区間	総合評価
C社・BCP法	-13.0	×	×
D社・改良BCP法	1.7	○	○
B社・BCG法	-8.3	×	×
E社・BCG法	-14.4	×	×
F社・BCP法	7.1	×	×

③ CRM470

メーカー名・測定法	相対残差（%）	95%信頼区間	総合評価
C社・BCP法	-2.7	○	○
D社・新BCP法	2.8	○	○
B社・BCG法	-3.8	×	○
E社・BCG法	-3.2	○	○
F社・BCP法	-1.8	○	○

CRM470はアルブミン以外の血清蛋白が含まれているため反応互換性は良好で、相対残差および

95 %信頼区間でも良好でどの試薬でも反応互換性は認められた。

常用参照および実用標準物質は暫定対照法と同じ原理の試薬、すなわち、アルブミン特異性を高めた試薬のみに反応互換性は認められたが、その他の試薬は認められなかった。

５-３-２-３．考察

血清アルブミンの日常検査試薬は２種類の測定試薬の異なる測定法が利用されているため、測定値の標準化の障害として下記のような問題点がある。

① CRM470 を用い、各社独自（ヒト血清近似）のキャリブレータを設定しているため、キット添付のキャリブレータ使用時のデータはばらつきが少ない。（CRM470 は血清ベースのため、グロブリンを含む。）

② BCG 法はグロブリンとも反応するため、BCP 法および免疫測定法と比較して高値を示す。

③ BCP 法はグロブリンとは反応しないが、酸化型アルブミンと還元型アルブミンとでは反応性が異なる。暫定対照法である改良 BCP 法はすべて酸化型に変換している為、血清が新鮮でも古くても差は生じないが、酸化剤を含まない BCP 法は新鮮血で低値を示す。

④ CRM470 補正値と常用参照標準物質補正値の相関をみると、両者の間にはＹ切片があり、両方間にはコミュータビリティが取れない。

図５に患者プール血清低濃度と中濃度試料について各標準物質補正での散布図を示した。

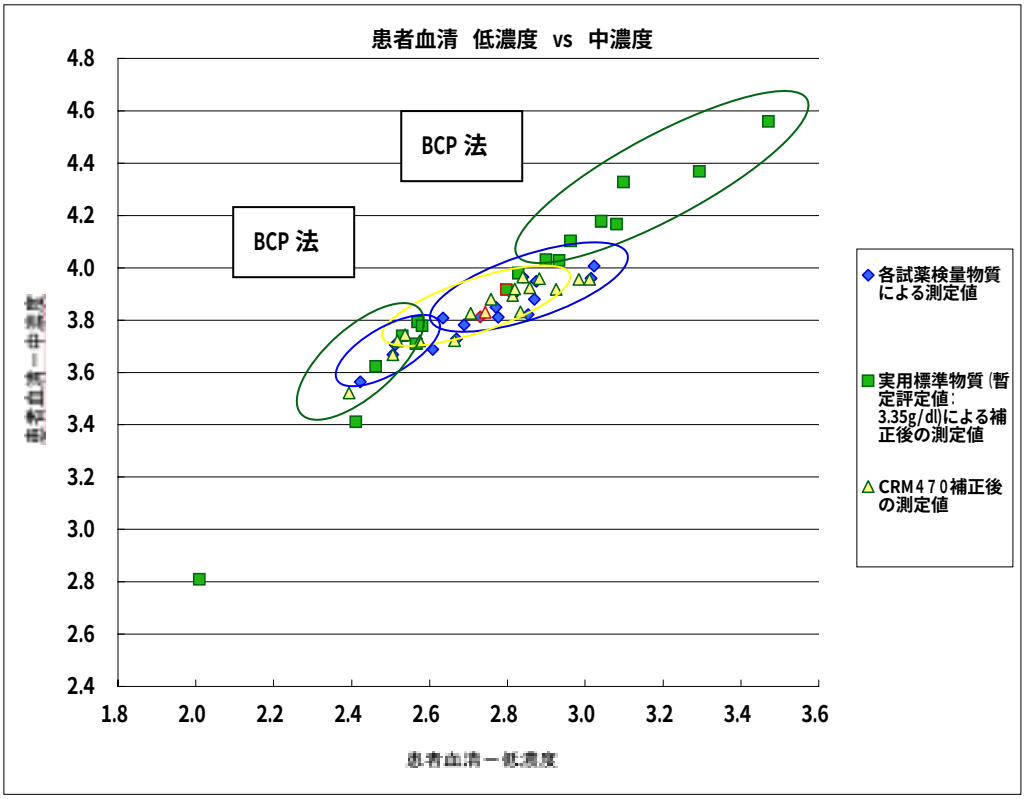


図５　各種キャリブレータを用いた場合のBCG法およびBCP法による患者血清測定値の相関

日常検査法で利用されている色素法では、利用する色素により血清蛋白に対する反応性が異なることが知られており、どの方法にも正確さを伝達させ、かつ反応互換性も併せ持つ実用標準物質の設定は測定法をアルブミンに特異性高い方法に改善しない限り不可能である。アルブミンに特異性が高い測定法（改良 BCP 法）が普及すれば、実用標準物質は十分利用可能であることが、今回の実験から確認できた。従って、反応特異性が異なる検査法が複数利用されている現状では、実用標準物質を各種メーカー測定法の校正用標準物質への値付けのための標準物質としての機能は十分に備えているが、アルブミンに対する特異性の低い測定法を使用している日常検査室で正確さの確認のために直接用いることはできない。

しかし、今回開発した常用参照および実用標準物質は純度や物理化学的特性に優れた標準物質であり、日常測定試薬のアルブミン特異性を確認する物質としても重要である。

６． 今後の課題

血清アルブミンのトレーサビリティと基準物質の連鎖の構築は検討段階であるが、一定の成果とその可能性は見いだすことができた。また実用基準物質についてはその規格に対応できる物質を作成することができた。今後は学会や日本臨床検査標準協議会による認証とその配布方法、また試薬メーカーによる企業内基準物質として普及することが課題である。

市販されている日常検査法はアルブミンに対して特異性が低い BCG 法が多く利用されており、特異性の高い BCP 法の早急な普及が課題であり、BCG 法を利用している限り血清アルブミンのトレーサビリティ連鎖は構築することができない。

７．まとめ

① 常用参照標準物質および実用標準物質を日常検査試薬の正確さの確認用標準物質としては新 BCP 法以外の方法には用いられない。

② 常用参照標準物質としては、その純度や物理化学的特性を規格化することで利用可能である。

③ 現在、日常的に使用されている血清アルブミン測定試薬はアルブミンに対する反応特異性に乏しく、便宜上、見かけ上の値を求めているにすぎない。そのため、校正用標準物質は各社異なり、共用出来ないのが現状である。また、BCG 法と BCP 法とではコミュータビリティ取れない。今回設定した常用参照標準物質および実用標準物質を日常法に使用出来るのは改良 BCP 法のみである。本研究により日常測定法の問題点が明確になった。

④ 血清アルブミンのトレーサビリティ連鎖は一次基準測定操作法としてアルブミン分解産物のアミノ酸を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）同位体質量分析法、標準物質と血清成分を含む製品検量物質へのトレーサビリティの確保のため、常用基準測定法として HPLC-BCG 法を開発した。これにより、図１に示したトレーサビリティ連鎖が確立した。

2-2-3-10　アルブミンの常用基準測定法

要旨

1）血清アルブミン測定の常用基準法設定は HPLC 法を基本とし、分離後のアルブミン検出法について主に検討を行った。紫外部吸収法（280 nm）、蛍光法（励起波長 285nm、蛍光波長 340 nm）、ポストカラム発色法（BCG 発色）の３法について行ったが、ネフェロメトリー法との予備相関から BCG 発色法を常用基準法試案（HPLC-BCG 法）として選定した。

2）HPLC-BCG 発色法とネフェロメトリー法との予備相関において、正の切片が認められたが、使用した BCG 試薬に起因した切片であることが明らかとなった。移動相と BCG 試薬を等量混合し発色液とした際に、血清の希釈試験が原点を通る直線となるように界面活性剤を増量した処方とした。また、アルブミンとグロブリンの分離能を向上させるためにカラム長を 20 cm（10 cm×２本）とした。

3）最終的にネフェロメトリー法との相関性を調べたところ、極めて良好な相関関係が得られ、透析患者や高ビリルビン血清における乖離例も認められなかった。しかし、普遍性の検討では施設差が比較的大きく、さらに測定プロトコルを見なおす必要があった。

4）HPLC-BCG 法を対照に日常検査法の評価を行ったところ、BCG 法および BCP 法は測定法の問題点からトレーサブル連鎖が成立しなかった。連鎖が確保できる可能性があった測定法は改良 BCP 法であった。

5）JCCLS 試作の実用標準物質との反応性は、日常検査法では改良 BCP 法においても患者血清とは若干異なった。また、メーカー差も認められた。

1．目的

現在、血清アルブミンの日常検査は BCG 法、BCP 法、改良 BCP 法の３法によって行われている。BCG 法が多くの施設で利用されているが、アルブミンのみならずグロブリンとも反応する問題がある。また、BCP 法はグロブリンとはほとんど反応しないもののアルブミンの酸化・還元型比率によって測定値が影響を受ける。それらの問題点を解消した測定法が改良 BCP 法であるが、反応性の違いから３法の測定値には差がみられる。この差は低濃度域で顕著に認められ、施設間差の要因となっている。一方、臨床側では肝硬変患者の治療法として分岐鎖アミノ酸製剤によって血清アルブミン濃度を増加させる方法が確立された。その投与基準は血清アルブミン値が 3.5 g/dL 以下とされているが、臨床の現場でも施設間差による混乱が発生しており、早急に血清アルブミン測定値の施設間差縮小への対策が望まれている。

現在、国際蛋白標準物質 ERM-DA470 が提供されているが、血清アルブミンに関してはその反応性に疑問を持つ声も多い。また、血清アルブミン測定の標準法が確立されてないことから、正確さに基づく測定体系の確立が急務である。現在トレーサビリティ連鎖としての基準測定法、常用標準物質、常用基準法の策定が行われており、本プロジェクトでは血清アルブミン測定の常用基準法の設定を行うことを目的とする。

２． 委員会の構成

代表者：村本良三（心臓血管研究所付属病院臨床検査部）
委　員：大澤　進（九州大学医学部保健学科検査専攻学）
委　員：伊藤喜久（旭川医科大学臨床検査医学講座）
委　員：林富士夫（神戸大学附属病院検査部）
委　員：沢田威男（自治医科大学附属病院検査部）
委　員：安原正善（神戸掖済会病院臨床検査部）
委　員：藤田　孝（藤田保健衛生大学病院臨床検査研究部）
委　員：大竹和子（慶応大学医学部附属病院中央検査部）
委　員：上地史朗（株式会社カイノス）
委　員：斉藤憲祐（デイドベーリング株式会社）
委　員：安川恵子（旭化成株式会社）

３．委員会の開催

必要に応じて e-mail による協議を行った。

４． 常用基準法の設定概要

常用基準法として、イオン交換カラムを用いた HPLC 法によってアルブミンを分離後、ポストカラムを用いて BCG 発色させる方法を採用した。検出系として BCG 発色を採用した理由を次に示した。

１）紫外部検出法でみられた他の低分子物質の影響がない。
２）蛍光検出法でみられた高ビリルビン検体の免疫学的測定法との負の乖離がない。
３）アルブミンとの反応がほぼ瞬時に終了する。
４）還元型と酸化型アルブミンの反応性に差がない。
５）δ-ビリルビン、内因性薬物結合阻害因子、薬剤など、アルブミン結合物質の影響が確認されていない。
６）血清を無希釈で測定するため、希釈誤差がない

４-１ 実験計画

４-１-１　使用カラム

Shodex-Asahipak 502N（内径 7.5 ㎜、長さ 10 ㎝）を２本使用した。陽イオン交換カラムであり、ポリマー系充填剤をゲル基材とし、その水酸基に DEAE 基を導入した樹脂を充填した HPLC 用カラムである。その基材である架橋ポリビニルアルコールゲルのゲル表面は親水性であるが、ゲルのポア内部は疎水性という特徴を持つ。したがって、ポア内に入らないタンパク質などの高分子は分子ふるい作用で先に溶出し、ポア内に浸透した低分子はゲルとの相互作用にて遅れて溶出するという特徴がある。更に、このゲルはアルブミンとの相互作用が強いという特徴がある。これらの特徴から、血清および血漿中のアルブミンと他のタンパク、

さらに低分子との分離が可能である。

4-1-2　移動相

移動相は検討の結果、塩化マグネシウム含有グリシン緩衝液（pH9.0：25 ℃）を処方とした。

1）塩化マグネシウム六水和物（$MgCl_2$・$6H_2O$：203.3）；特級：220 mM

2）グリシン（H_2NCH_2COOH：75.07）；特級：50 mM

3）水酸化ナトリウム（NaOH：40.0）；特級：適当量

4）アジ化ナトリウム（NaN_3：65.01）；化学用：0.1 %

4-1-3　BCG 試薬

BCG 試薬は移動相と等量混合するため、通常の 2 倍濃度とした。また混合試薬を用いて行った血清希釈試験において直線回帰が原点を通る処方とした。

1）BCG（$C_{21}H_{14}Br_4O_5S$：698.2）；特級：0.3 mM

2）クエン酸一水和物（$C_6H_8O_7$・H_2O：210.14）；特級：0.15 M

3）Brij-35（Polyoxyethylene（23）Lauryl　Ether）：3 %

4-1-4　測定条件

1）流速：1.0 ml/min（BCG 溶液混合後 2.0 ml/min）

2）カラム温度：45 ℃

3）分析時間：20 分

4）検体量：5 μl

5）検出波長：628 nm

4-1-5　実験内容

1）アルブミン分画の確認（SDS-PAGE 後の銀染色および微量アルブミン測定）

2）BCG 試薬処方の再検討（希釈試験による確認）

3）免疫学的測定法との相関

4）不偏性の検討

5）日常検査法との相関

6）JCCLS 常用標準物質と ERM-DA470 の反応性比較

4-2　共同実験

4-2-1　測定試料

相関および各種検討には、なるべく新鮮な血清あるいはその凍結品を用いた。相関の検討には高ビリルビン血清、透析患者血清、M タンパク血清を含めた。

4-2-2　測定方法

1）免疫学的測定法はデイド社の BN-Ⅱ（ネフェロメトリー法）を用いた。

2）日常検査法は、BCG 法（和光）、BCP 法（東洋紡）、改良 BCP 法（カイノス、シノテスト、セロテック、和光）の 3 法，計 6 試薬を用い、指定パラメーターにしたがって自動分析装置で測定した。BCG 法は反応時間 30 秒と 10 分の 2 法を行った。

4-2-3　実験結果

1）アルブミン分画の確認：アルブミンとグロブリン分画に相当するフラクションについて SDS-PAGE 後、銀染色を行った。アルブミン分画は 66　kDa 付近に単一バンドが認められ、またグロブリン分画ではその付近にバンドが認められなかった。微量アルブミン測定においても、測定値が得られたのはアルブミンのフラクションのみであり、他では認められなかった。

2）BCG 試薬処方の再検討： BCG 試薬は当初 Doumas 処方を２倍濃度にしたものを使用したが、生化学用自動分析器を用いた移動相液との等量混合による血清希釈試験を行ったところ、原点を通らないことが判明した（図１処方Ａ）。界面活性剤を増量することで、この問題が回避可能であったことから、処方を変更した（図１処方Ｂ）。なお、緩衝液の種類や pH に関しては詳細な検討を行っていない。グロブリンとの反応性には差があることが報告されているが、ヒトアルブミンの定量分析に関しては問題ないものと思われる。

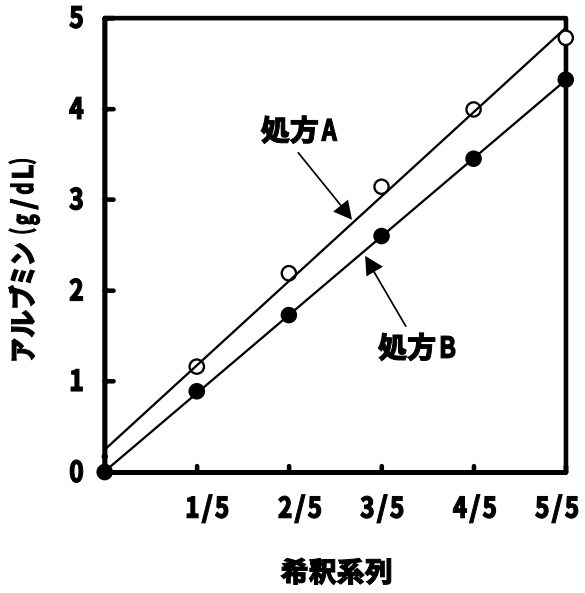


図1　BCG試薬処方の違いと血清希釈試験

処方A：BCG；0.3mM，コハク酸緩衝液（pH4.2）；0.15M，Brij35；0.24%
処方B：BCG；0.3mM，クエン酸緩衝液（pH3.8）；0.15M，Brij35；3%

3）免疫学的測定法との相関：共通標準液としてN-タンパク標準血清 SL（デイドベーリング）を用いた際のネフェロメトリー法との相関を図２に示した。相関係数ならびに回帰式は極めて良好であり、透析患者血清、Mタンパク血清、高ビリルビン血清における乖離例も認められなかった。

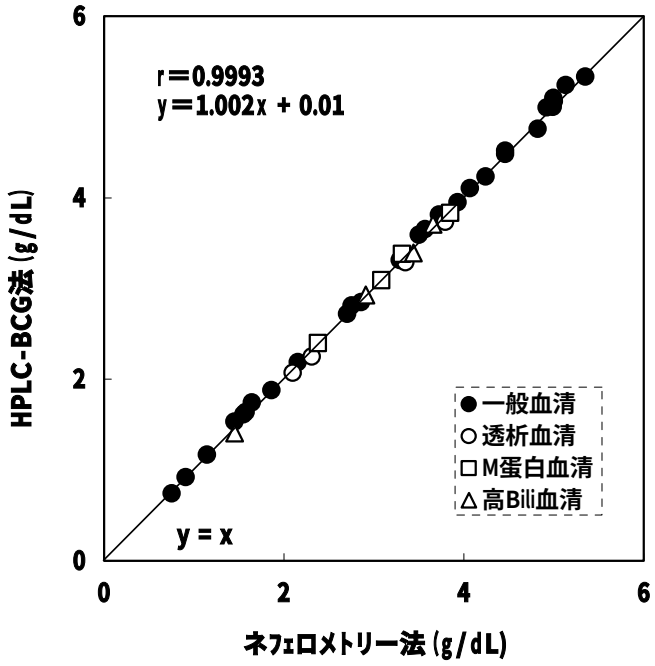


図2　ネフェロメトリー法との相関

４）不偏性の検討：JCCLS 試作の常用標準物質を標準とし、５施設において７試料を測定した。その結果を表１に示したが、施設間差は若干大きな成績であった。

表１　５施設における普遍性の成績

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	試料 6	試料 7
平均（g/dL）	1.81	2.38	3.12	3.54	4.44	4.94	5.40
±SD（g/dL）	0.099	0.104	0.134	0.097	0.128	0.099	0.160
CV（%）	5.5	4.4	4.3	2.7	2.9	2.0	3.0

５）日常検査法との相関：常用基準法試案（HPLC-BCG 法）を対照とし、市販の改良 BCP 法（Ａ社～Ｄ社)、BCG 法(反応時間 30 秒と 10 分)、BCP 法との相関性を表 2 に示した(n=36)。標準液には JCCLS の実用標準物質（試作品）を共通に使用した。また、表示値は暫定的に 3.34ｇ/ｄL として測定を行った。BCG 法では血清中のグロブリン分画の測り込みが回帰式の傾きと切片に現われており、また BCP 法では実用標準物質のアルブミン中の低還元型比率に起因した反応性の問題が回帰式の傾きに現われた成績となった。改良 BCP 法ではほぼ良好な相関が得られたが、B 社試薬では反応性が他社と若干異なる態度を示した。具体的には実用標準物質に対する反応性が患者血清に比べて若干高いために患者試料が低値に測定される傾向があり、また高ビリルビン血清および透析患者血清において負の乖離を示す

検体がみられた。

表 2　常用基準法試案（HPLC-BCG 法）と日常検査法との相関

		平均(g/dL)	相関係数	回帰式
改良 BCP 法	A社	3.32	r＝0.998	y＝0.996x＋0.03
	B社	3.17	r＝0.994	y＝0.984x-0.07
	C社	3.32	r＝0.998	y＝0.999x＋0.02
	D社	3.25	r＝0.999	y＝0.949x＋0.12
BCG 法	30 秒法	3.69	r＝0.998	y＝0.923x＋0.64
	10 分法	3.92	r＝0.995	y＝0.911x＋0.91
BCP 法		2.87	r＝0.993	y＝0.803x＋0.22

＊HPLC-BCG 法の平均値は 3.30ｇ/ｄL

６）JCCLS 常用標準物質と ERM DA470 の反応性比較：JCCLS の血清アルブミン測定用常用校正物質（試作品）の反応性を ERM DA470 と比較した。両者を基準とし、相関の検討に用いた透析患者血清などの特殊検体を除いた患者血清 21 例の平均値を比較した。HPLC-BCG 法の平均値を 100 とした場合の各測定法の平均値をプロットしたものを図４に示した。BCG 法では血清タイプの ERM-DA470 基準の方が JCCLS 基準に比べて若干収束されたものの、いずれも 10%以上高値を示した。また、BCP 法も ERM DA470 基準の収束性が良かったが、本要因はアルブミン中の還元型比率に起因しているものと考えられ、JCCLS 標準品中のそれはかなり低いことが推測された。一方、改良型 BCP 法では JCCLS 基準が 97.7～101.1、ERM-DA470 基準が 99.4～102.9 であり、前者の収束性が若干良く HPLC-BCG 法とほぼ一致した結果を得ることが出来た。しかし、患者血清と標準品にはわずかに反応性の違いがあり、またメーカー差が認められた。その要因に関しては、試薬組成の統一化も含めて今後の検討課題である。

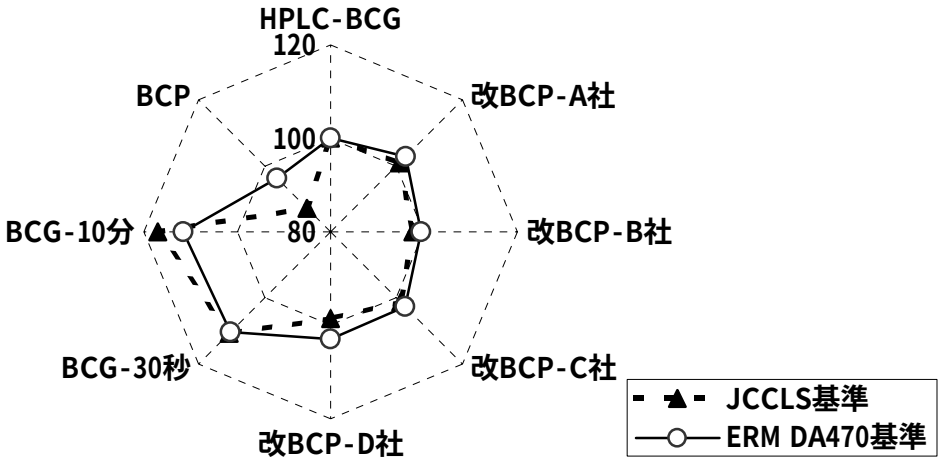


図4　常用標準物質（JCCLS試作品）とERM DA470の反応性の比較

５．実試料標準物質の作製プロトコル

５-１ トレーサビリティ連鎖

血清アルブミンの測定体系を図 5 に示した。基準測定法は検査医学標準物質機構（旧 HECTEF スタンダードレファレンスセンター）にて、実用標準物質（２次標準物質）は JCCLS にて、常用基準測定法は JSCC にて作業中であり、ほぼ確立されつつある。一方、日常検査法を考えると、BCG 法は血清中のグロブリン量によって、また BCP 法はアルブミン中の酸化還元型比率によって測定値が変動するためトレーサビリティ連鎖が確保できない。トレーサビリティ連鎖が確保できる可能性があった日常検査法は改良 BCP 法のみであった。しかし、改良 BCP 法においても JCCLS の実用標準物質試作品との反応性は患者血清とは若干異なり、またメーカー差も認められる。実用標準物質を確実にトレーサブルできる常用基準測定法の確立と患者血清と同じ反応性の常用標準物質が必要である。

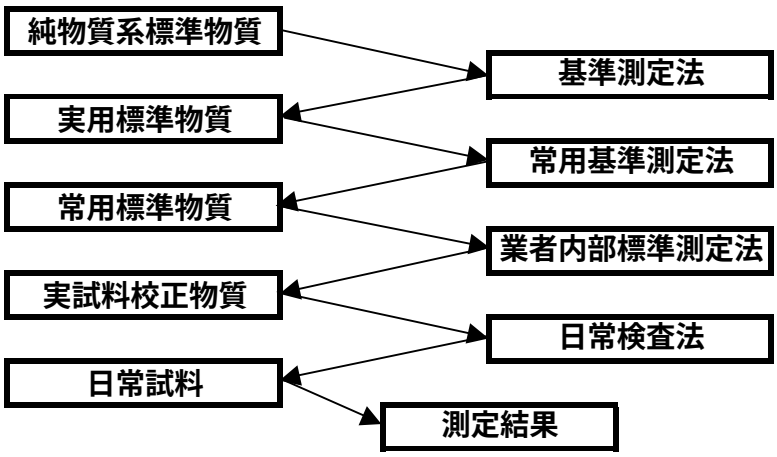


図５　血清アルブミンの測定体系

５-２　試料の性状規格

JCCLS が試作中の実用標準物質は、ヒト血清アルブミンのモノマーのみを HPLC 分析で 98%以上の純度にした凍結乾燥品である。その性状規格の詳細については、平成 18 年度成果報告書の P.169 を参照願いたい。

５-３　値付けの方法

検査医学標準物質機構にて実施中である。

6． 今後の課題

1）常用基準法の普遍性について現在検討中であるが、施設差が大きい結果となっている。測定プロトコルを見直す必要がある。

2）JCCLS 常用標準物質との各種測定法の反応性を確認する。

3）常用基準法試案を JSCC へ勧告法として提出を準備する。

4）常用標準物質への値付けを行う。

7．結び

基準測定法、実用標準物質、常用基準測定法の策定が進んでいるが、アルブミン分子の不均質性や測定法の問題からトレーサビリティには若干問題が残ることが予想される。特に測定法の問題は大きく、今後試薬組成も含めた測定法の統一化が必要と考えられる。

2-2-3-11　　尿アルブミン

要旨
1）尿アルブミン常用標準物質の品質規格を策定した。
2）策定した品質規格に適合した尿アルブミン常用標準物質を作製した。
3）本常用標準物質の値付けは、CRM470 を上位標準物質として実施する。

1．目的

尿中微量アルブミン測定は、糖尿病早期腎症の診断基準（30-300 mg/day、30-300 mg/g Cr）、治療、経過観察、予後の推定に不可欠な検査である[1)]。近年、脳血管、循環器障害のリスクファクターとしても、大きな関心が寄せられている。尿中微量アルブミンの精密測定は抗原抗体反応の原理に基づく免疫学的測定法による。日常検査の試験紙検査蛋白定性検査では色素法（ブロムフェノールブルー法）により尿中アルブミンを検出するが、同一原理で微量アルブミンを高感度に検出する試験紙検査法も導入され、厚生労働省の診断基準にも組みいれられている[1)]。さらに、尿中総蛋白量定量法においても、主にヒト血清アルブミン（Human serum albumin; HSA）が検量物質として用いられ、腎疾患の確認診断、フォローの指標として、尿中測定の意義はきわめて高い。

しかし、腎臓病学会（GFR）・糖尿病学会の合同委員会調査報告に見られるように、尿中微量アルブミン値は測定システム間に乖離が見られ、検査結果の互換性が低い現状にある[2,3)]。尿総蛋白定量、試験紙検査においても同様で、この解決に日本臨床検査標準協議会（JCCLS）では、尿試験紙検査の標準化を推進し、尿蛋白検査の定性判定基準として、30 mg/dL (300 mg/L)を(+)と定めている。問題は、基準となる物性の明らかな標準物質が存在せず、また値付け方法も標準化されていないため各社が独自に用意した検量物質により定められており、互換性は保障されるものでない[4)]。このように尿蛋白検査には全ての項目に渡り標準化が必要とされ、検査精度保証システムの枠組みの中で研究を重ねてきた。昨年度までに問題解決を目的に、著者らは尿アルブミン測定の常用標準物質 Prototype I および Prototype II を試作し、IFCC が作製した血清蛋白国際標準品 CRM470[5,6)]から値付けトライアルを実施するなど、広く本標準物質の利用性を探索し報告した[7-9)]。

本年度は、尿アルブミン測定標準物質の量的な確保を目指して最終ロット作成し、Prototype I および Prototype II の試作を通して設定した規格に対する確認を行った。

表1　尿アルブミン測定常用標準物質規格

項　　目	規　　格
1．適用範囲	本品はヒト尿試料を対象とする常用校正物質として使用することを目的とする。 対象となる測定方法は、以下の1）～3）とする。 1）尿総蛋白定性法（試験紙法） 2）尿総蛋白比色定量法 3）尿中ｱﾙﾌﾞﾐﾝ定性法（試験紙法） 4）尿中ｱﾙﾌﾞﾐﾝ免疫測定法
2．原料 2ー1．起源	ヒト血清を起源とする。
2-2．基材	ヒト血清ｱﾙﾌﾞﾐﾝ
2-3．添加剤	緩衝材および安定化剤を添加する。
2-4．感染物質	本品は、原料であるヒト血液のHBs抗原、HCV抗体、HIV-1抗体および2抗体の検査を行い、陰性の結果を得ていること。 注意）感染性物質の検査で陰性の結果を得ていても、感染の可能性を完全に否定できるものではありません。また、それ以外の感染性物質の検査は実施していませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱う。
3．特性 3-1．形状	凍結乾燥品
3-2．包装	ガラスバイアル、2 mL（使用時）の単品
3-3．反応性	ヒト尿と同様な挙動を示す。
3-4．物理学的性質 3-4-1．分子量	SDS-PAGEで67 kDaである。
3-4-2．純度	HPLC分析で95 %以上。
3-5．安定性 3-5-1．開封前の安定性	1）有効期間：5年（10 ℃以下冷蔵）を目標とするが、最終的には安定性試験終了後に決定する。 2）有効期間内でのモノマーアルブミン残存量は95 %以上である。
3-5-2．開封後の安定性	10 ℃以下の保管で8時間使用できる
3-6．均一性	1）10バイアルの3回反復測定を行い、そのときのﾊﾞｲｱﾙ間差は±3 %以内とする。 2）不確かさを表記する
4．アルブミン濃度	使用時に300±50 mg/dLとする。

３．委員会の構成

氏　　名	所　　属
委員長　伊藤　喜久	旭川医科大学臨床検査医学講座
委　員　市原　清志	山口大学医学部保健衛生学科
細萱　茂美	山梨大学医学部付属病院検査部
芝　紀代子	東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科
山口　哲史	（株）アークレイ
鈴木　紘子	（株）アークレイ
上村　八尋	国際試薬（株）
渡津　吉史	国際試薬（株）
的場　功始	シスメックス（株）
岸　　浩司	シスメックス（株）

３．委員会の開催

委員会の開催は以下のとおりであるが、その他の連絡は電子メールで行った。

2006 年 10 月　最終ロットの作製

2007 年 7 月　 作製プロセス、規格検査の結果報告

４．標準物質の設定概要

４‐１‐１．トレーサビリティ連鎖

昨年度までにアルブミン測定のトレーサビリティ連鎖を図１のように提案した。本来、アルブミンの測定においても最上位の高純度標準物質はSI単位に繋げられるような物質から標準測定法を用いて、実用標準物質に値を伝達する。さらに、この値を常用標準物質に伝達し、日常検査に繋げるものであるが、最上位の高純度標準物質が現在検討されている状況でもあり、暫定的な実用標準物質を上位の標準物質としてアルブミン測定のトレーサビリティ連鎖を構築した。尿アルブミン常用標準物質として Prototype Ⅱを作製し、一連の評価試験を終了させた。本常用標準物質の値付けについては、上位標準物質として CRM470 を暫定的に用いることによりトレーサビリティ連鎖を完成させている（7〜9）。

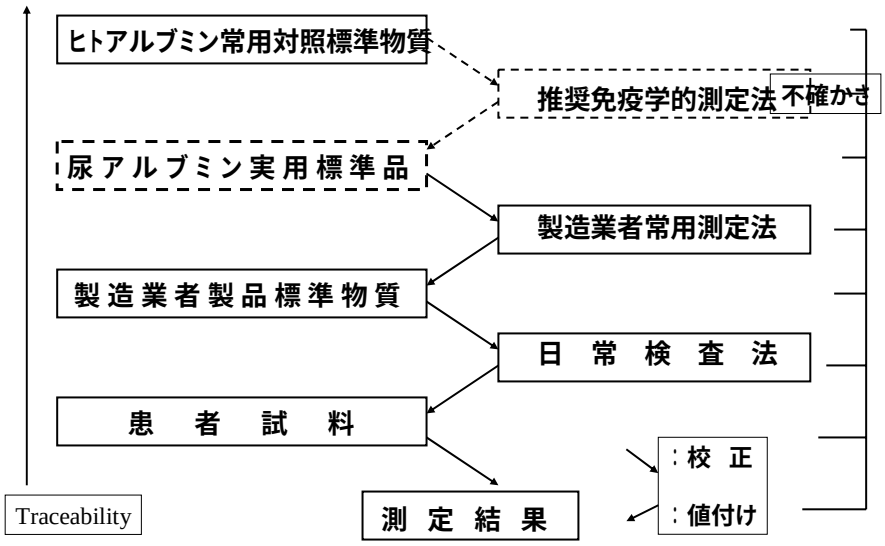


図1 尿Albumin 測定のトレーサビリティ連鎖体系

4-1-2．尿アルブミン常用標準物質の設定概要

常用標準品作製に当たっては、基準となる物質の構造、物性の定義化、各測定システム間、システム内における一次標準品からサンプル中の対応物質までの comparability、traceability の確保、以下に示す仕上げ内容の基本性能などが少なくとも満たされ、長期間安定供給の下で、継続利用が望まれる。

本標準品においては、微量アルブミン尿診断基準上限値の 300 mg/L に近似させ濃度設定することにした。この作製過程で、日本臨床検査標準協議会（JCCLS）から、尿試験紙検査蛋白の判定基準 1＋を 30 mg/dL (300 mg/L)と定める基準の公表がなされ、設定値の利用性が拡大した [4)]。

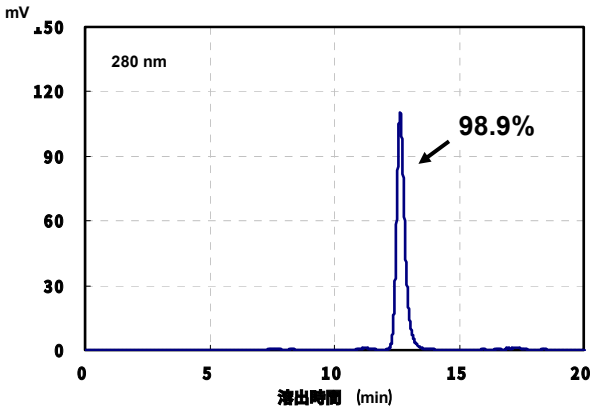
5-1．尿アルブミン常用標準物質の作製

5-1-1．尿アルブミン常用標準物質（最終ロット）の作製

過去に Prototype I の作製は、材料として HSA fraction V を原材料として用いており、混在する成分も多いことから、陰イオンカラム、陽イオンカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過法の 3 ステップで精製した。Prototype II は市販の HSA の高純度のものを購入して starting material（Sigma, USA、純度 98 %）として、ゲル濾過法の１ステップのみとして、回収効率を高めた。すなわち 10%HSA 溶液を純水に 10 ℃で 16 時間透析後、Sephacryl S200（GE ヘルスケア バイオサイエンス、東京）で HPLC により単量体を分離精製した。これを 20 mM PBS (pH 7.2)に添加し、凍結乾燥処理し、窒素ガスで置換、保存した。濃度は純水を 2mL 添加して約 300 mg/L になるよう調整した [8)]。

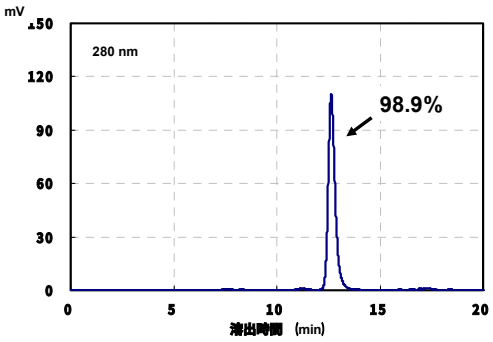
本研究による最終ロットは、量的な確保も考慮して、Prototype II の作成方法を採用した。9.51 g の高純度ヒトアルブミン原料から 3.44 g の単量体アルブミンを得て、2mL 溶解で約 300mg/L となるように凍結乾燥し、5000 本の最終ロットを得ることができた（図 2)。

精製度は HPLC ゲルろ過法（図 3)、SDS-PAGE、Native PAGE（図 4）より確認し、単一ピーク、バンドを示し、いずれも 95 %以上の純度であり、分子量は 67 kDa であった。シナピン酸をマトリックスとする MALDI-TOF MASS（Bruker 社, Germany）分析では、単一ピークとして、他の夾雑物質の混在もほとんど認めらなかった（図 5)。



Column	TSKgel G3000SW$_{XL}$ 7.8 mm I.D.×30 cm
Buffer	0.1 M Na-Phosphate buf. + 0.15 M NaCl (pH7.1)
Flow Rate	1.0 mL/min
Detection	280 nm
Sample Vol.	100 µL

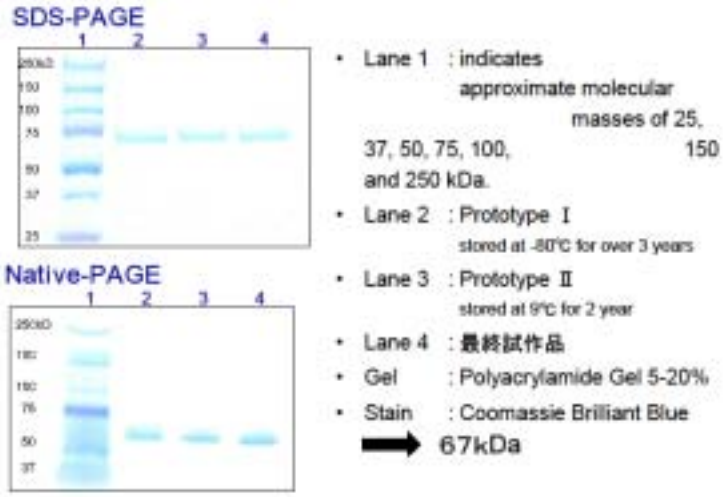
図3 HPLC分析の結果



Column	TSKgel G3000SW$_{XL}$ 7.8 mm I.D.×30 cm
Buffer	0.1 M Na-Phosphate buf. + 0.15 M NaCl (pH7.1)
Flow Rate	1.0 mL/min
Detection	280 nm
Sample Vol.	100 µL

図3 HPLC分析の結果

図4 電気泳動分析結果



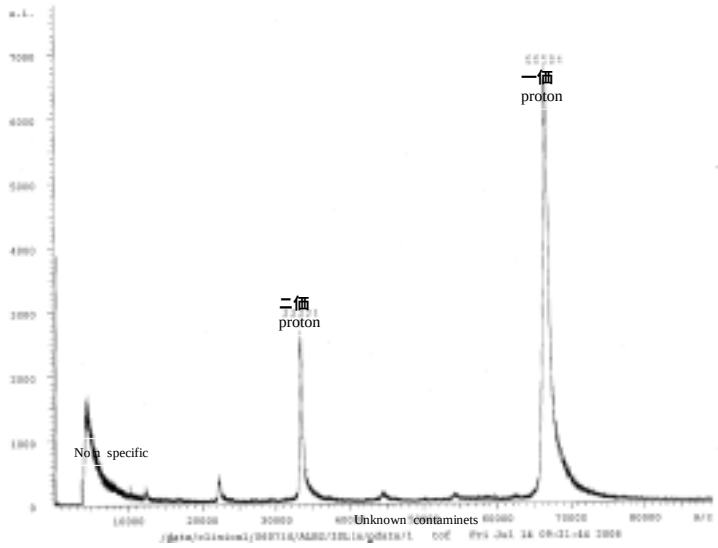


図5 TOF MASSによる精製度、分子サイズ検討

5-1-3．最終ロットの性状

Prototype I、II の研究結果を踏まえ、尿アルブミン常用標準物質に相応しい製品規格を策定した。最終ロットの性能を測定したところ、すべての項目において規格に合格した（表 2)。

表2　規格試験結果

試　験　項　目	規　　格	結　　果	判　　定
物理化学的性質			
分子量	分子量：約67 kDa (SDS-PAGE)	分子量：約67 kDa	合格
純度	モノマーALB含有率：95 %以上 (HPLC分析)	モノマーALB含有率 面積比率：98.9 %	合格
溶解後安定性	冷蔵保存下で8時間使用可	冷蔵保存下で 10時間の安定性を確認	合格
バイアル間差	CV値 3 %以内の バイアル間差	mALB:CV値 1.28 % mTP：CV値 1.43 %	合格
アルブミン濃度	300±50 mg/L以内	339.2±17.6 mg/L	合格

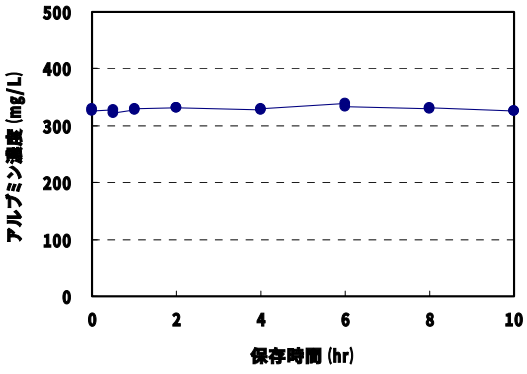
1）病原微生物検査

原材料の安全性は購入時点で保証されている。本標準品については、㈱エスアールエル（東京）で、HBs 抗原、HIV-I,Ⅱ抗体、 HCV 抗体、HBc 抗体、*Toreponema pallidum* 抗体、HTLV 抗体検査を行い、いずれも陰性であることを確認した。

2）バイアル間差、凍結乾燥品の溶解後の安定性

日立自動分析装置（日立 7170S)、シスメックス社の試薬（ALB 試薬･K「ｺｸｻｲ」、TP 試薬･K「ｺｸｻｲ」）で BCR レポートに従い測定した[9)]。アルブミン、総蛋白濃度（TP）について 10 バイアルを測定し、CV はそれぞれ 1.28 %、1.43 %と良好な結果を得て、バイアル間の均一性が示された。

純水で溶解後、冷蔵保存で継時的に 10 時間フォローしたが、濃度変化はなく高い安定性を確認した（図 6)。なお、長期保存安定性は、Prototype I、PrototypeⅡは安定性を維持しているが、最終ロットを含め各ロットについて引き続き安定性をフォローする。



分析機： Hitachi automated analyzer model 7170S
試　料： 尿アルブミン測定常用標準物質（最終ロット）
試　薬： 免疫比濁法試薬（ALB 試薬・K「ｺｸｻｲ」, Sysmex Corp.）

図6 溶解後の安定性

４）表示値

現在、本標準品の表示値の設定は、Prototype II で実施した方法と同様に ISO Guide 35, BCR report に従い CRM470 から本標準品に値付けを行う予定である [7-11]。ただし、規格試験で、2 mL の純水に溶解の条件で免疫学的測定法によるアルブミン濃度は 339.2 ± 17.6 mg/L (mean ± 1 SD) であった。

おわりに

尿中アルブミン測定法の標準化を目指して、予備研究、調査も含め過去 5 年間にわたり、測定値のばらつきの要因究明と縮小に努めてきた。本年度は、常用標準物質を多量に確保するために、高純度の単量体ヒト血清アルブミンを得て、最終ロットの標準物について、5,000 バイアルを作製した。今後、値付けは CRM470 から実施し、尿を中心に種々の体液における総蛋白、アルブミン定性、定量試験などの標準化への応用利用を展開する予定である。血清、各種体液の測定値が、CRM470 を共通基盤として病態診断、治療がなされることは、関連領域の臨床利用に大きな光明を与え、とりわけ、これまで腎泌尿器領域で課題とされた蛋白測定の諸問題の解決に寄与するものと考える。さらに一層病態解析、補助診断、予後推定、フォローなど共通基盤の上での臨床判断の充実が導かれることが大いに期待される。

文献

1）平成３年度糖尿病調査研究報告書　厚生省、p320, 1992.

2）堺　秀人、吉川　隆一、赤沼　安夫、磯見　　庄、金澤　康徳、矢島　義忠、荒川　正昭、富野康日己、槙野　博史、黒川　清. 尿中アルブミン濃度の正常値についての検討　日本糖尿病学会・日本腎臓学会　糖尿病性腎症合同委員会　糖尿病　2001；44（4）：467-472

3）日本腎臓病学会（GFR）・尿蛋白測定委員会報告書　日腎会誌　2002; 43(1):1-19.

4）伊藤　機一　2004 年度 JCCLS 尿検査標準化委員会活動報告、p9, 2004.
5）Itoh Y, Ichihara K, Kanno T, Sugawara T, Ohkubo A, Hirabayashi Y, Igarashi S, Kawano K, Iwata S, Saito K, Kawai T.　Serum protein standardization project in Japan: evaluation of an IFCC reference material (RPPHS/CRM470) and establishment of reference intervals. J Clin Lab Anal. 1997;11:39-44.
6）Baudner S, Johnson AM, Blirup-Jensen S, Whicher JT.　The certification of a matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins. CRM470. in BCR information. European commission, 1992.
7）渡津　吉史、伊藤　喜久，尿中微量アルブミン測定標準化，臨床化学，2004, 33 (2)：27b-28b
8）伊藤　喜久, 尿アルブミン　臨床検査用標準物質の研究開発, ｐ171-185, 平成 18 年度報告　新エネルギー・産業技術総合開発機構、2006 年 5 月、東京
9）Itoh Y, Hosogaya S, Kishi K. Preparation of a highly purified monomeric human albumin for standardization of urinary albumin immunoassay. Urinary albumin measurement of NKDEP/IFCC recommendations, 2008, in press.
10）Baudner S. et al. BCR information、Reference materials. Report Eur 15243, 1993.
11）ISO GUIDE 35: Certification of reference materials- General and statistical principles. 1989.

2-2-3-12　膵型アミラーゼ

要旨

1）膵型アミラーゼ活性測定の常用基準法設定の基本方針は、抗ヒト S-AMY 抗体を用いて S 型アミラーゼ活性を阻害した後、残存した膵アミラーゼの活性を総アミラーゼ活性測定 JSCC 勧告法で行うことを基本とした。

2）２社、4 種類の抗ヒト S-AMY 抗体による S-AMY 活性阻害条件の検討を実施し、P-AMY 活性に全く影響なく、S-AMY 活性を 95%以上阻害する条件を確立した。

3）抗ヒト S-AMY 抗体は被検体に予め添加処理するのではなく、アミラーゼ活性測定試薬を添加する方法とした。

4）JC・ERM（Lot005）は、膵型 AMY 活性測定の常用標準物質として使用できることが確認できた。

5）膵型アミラーゼの基準範囲が設定できた。

1．目的

アミラーゼは膵特異性が低く、膵疾患の診断には特異性の高い膵アミラーゼの測定が有用である。現在日常検査に用いられている膵型アミラーゼ測定法は、抗ヒトＳ抗体を用いたＳ型アミラーゼ阻害法が主流である。膵型アミラーゼ活性測定値は、測定に用いる基質の違いにより、その活性値は最大約２倍の差がある。

そこで、本プロジェクトでは、膵型アミラーゼ活性測定値における施設間差を縮小しデータの共有化を行うために常用基準法設定と標準物質の選択を目的とする。

2．委員会の構成

実用標準物質および常用基準法の開発：日本臨床化学会　酵素・試薬専門委員会

膵型アミラーゼ活性常用基準法開発プロジェクト（委員長：白井秀明　関東労災病院検査科）

代　表　　白井秀明（関東労災病院　検査科）

副代表　　桑　克彦（筑波大学臨床医学系）

関口光男（前日本大学板橋病院臨床検査部）

委　員　　大澤　進（九州大学医学部保健学科）

細萱茂美（山梨大学医学部附属病院検査部）

飯塚儀明（筑波大学附属病院検査部）

芳賀利一（三井記念病院中央検査部）

加藤隆則（株日立製作所日立健康管理ｾﾝﾀ）

斉藤友幸（筑西市民病院臨床検査科）

大貫経一（国立精神・神経センター国府台病院臨床検査科）

野村　博（ﾛｼｭ･ﾀﾞｲｱﾉｽﾃｯｸｽ株）

大和　隆（臨床検査薬協会技術委員）

谷　　渉（ReCCS　ﾚﾌｧﾚﾝｽｾﾝﾀｰ）
鈴木英明（第一化学株式会社）
花田寿朗（和光純薬工業株式会社）
足立　浩（ｱﾙﾌﾚｯｻﾌｧｰﾏ株式会社）
新井信夫（ｼｽﾒｯｸｽ株式会社）
顧　問　　渡辺伸一郎（南千住病院）

３．委員会の開催

第５回プロジェクト委員会	平成 18 年 12 月 4 日
共同実験	平成 19 年 1 月 12 日から 13 日
阻害率普遍性試験	平成 20 年 2 月 28 日から 3 月 1 日

４．標準物質の設定概要

４－１　実験計画

４－１－１　　S 型 AMY 阻害試験法

S 型 AMY 活性の阻害率の確認と抗 S-AMY 抗体の至適添加濃度確認試験を以下に示す。

１）抗ヒト S-AMY 抗体は、Tu88E8 IgG（メイン抗体）と Tu66C7 IgG（サブ抗体）の混合抗体（A 社製）および MNH AMY-３（メイン抗体）と MNH AMY-２（サブ抗体）の混合抗体（B 社製）を用いる。

２）測定試料は、キャリブザイム AMY-S（ヒト唾液由来：C 社製）および
キャリブザイム AMY-P（ヒト膵液由来：C 社製）を用いる。

３）P-AMY 活性の測定試薬は、JSCC 常用基準法試薬（基質：EtG7-PNP）に抗ヒト S-AMY 抗体を添加した試薬を用いる。

４）阻害率の算出は、JSCC-AMY 常用基準法試薬で測定した吸光度（T-AMYAbs）を対照とし抗ヒト S-AMY 抗体を段階に添加した JSCC 常用基準法試薬ごとに阻害率を算出する。S 型 AMY の阻害率は、以下の式より求める。

阻害率（%）＝（BAbs－ T-AMYAbs）／T-AMYAbs×１００

BAbs　　：抗ヒト S-AMY 抗体添加試薬の吸光度

T-AMYAbs ：JSCCAMY 常用基準法試薬の吸光度

５）抗 S-AMY 抗体至適添加濃度は、S 型 AMY が 95%以上阻害したときの添加量とする。

４－１－２　標準物質候補品を用いた反応性評価試験

標準物質候補品の反応性評価試験を以下に示す。

１）精密さの確認：ランダマイズ２回測定（50 件×2＝100 件）

２）相関分析：（1）P-AMY 常用基準法（案）をＸ軸に、各社市販キットをＹ軸取り相関分析を行う。

（2）患者血清：300-500 件を用いる。

（3）各社のキャリブレータ，管理物質および P-AMY 測定用

ERM 候補品（JC-ERM　Lot005：各 5 重測定)

３）有意差検定：(1)管理物質の個々の Y の 95%信頼区間を用いる方法。

(2)相対残差の 100±5%を用いる方法。

4-1-3　　S-AMY 阻害試験の普遍性試験および常用基準法（案）の施設間差

S-AMY 阻害試験について、用手法５施設，自動化法６機種について実施した。また、P-AMY 常用基準法（案）についても実施し測定値の施設間差と機種間差を確認した。

4-2　実験方法

4-2-1　　S 型 AMY 阻害試験

１）測定試料

キャリブザイム AMY-S，AMY-P を用いた。なお、S 型 AMY，P 型 AMY の活性値を考慮し所定の溶解量および 1/2 容で溶解した試料についても実施した。

２）抗ヒト S-AMY 抗体

Tu88E8 IgG，Tu66C7 IgG の混合抗体および MNH　AMY3，MNH　AMY2 の混合抗体の２種を用いた。

３）分析装置と測定条件

汎用型生化学自動分析装置（日立 7180）を用い、表１の測定条件で実施した。

表１　　測定条件（日立 7180）

Assay type	RATE-A
反応時間	１０分
測定ポイント	２７-３４
測定波長（主／副）	４０５／６６０
検体量（μL）	8
試薬量 R1（μL）	２００
試薬量 R2（μL）	４０
K ファクター	１０，０００

なお、K ファクター＝10,000 は、吸光度算出のために用い、試薬ブランクのみ実施した。

４）測定試薬

JSCC AMY 常用基準法試薬に抗ヒト S-AMY 抗体を添加して用いた。なお、抗ヒト S-AMY 抗体は、R1 試薬にのみ添加し、R2 試薬については、JSCC AMY 常用基準法試薬をそのまま用いた。

①JSCC AMY 勧告法試薬の調整

R1 試薬を 1000 mL、R2 試薬 200 mL を試薬終濃度（表２）になるように調整した。

表２　試薬終濃度

N-2-ﾋﾄﾞﾛｷｼｴﾁﾙﾌﾟﾛﾊﾟｼﾞﾝ-N'-ｴﾀﾝｽﾙﾎﾝ酸（HEPES）	50 mmol/L
pH（37 ℃）	7.00±0.03
4.6-ｴﾁﾘﾃﾞﾝ(G1)-4-ﾆﾄﾛﾌｪﾆﾙ(G7)-α-(1->4)-D-ﾏﾙﾄﾍﾌﾟﾀｲﾄﾞ (ENM)	5 mmol/L
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	70 mmol/L
α-ｸﾞﾙｺｼﾀﾞｰｾﾞ(37 ℃)	135 μkat/L(8100 U/L)
試料容積比	0.03226(1:31)

②抗ヒト S-AMY 抗体添加試薬の添加系列（表３）

抗ヒト S-AMY 抗体の JSCC AMY 常用基準法試薬への添加は、R1 試薬にのみ添加した。R2 試薬は、JSCC AMY 勧告法試薬をそのまま用いた。抗ヒト S-AMY 抗体の添加は、メイン抗体のみ，サブ抗体のみ，メイン抗体固定でサブ抗体およびサブ抗体固定でメイン抗体の段階系列試薬 32 種を作成し用いた。添加量は、メーカーが推奨する添加量を１容とし、４倍容から０容まで添加して使用した（表３）。なお、メーカーが推奨する添加量終濃度は、Tu88E8 IgG（メイン抗体）が 100mg/L，Tu66C7 IgG（サブ抗体）が 10mg/L で MNH AMY3（メイン抗体）が 10 mg/L，MNH AMY2（サブ抗体）が 10mg/L である。

③抗ヒト S-AMY 抗体添加試薬の調整

第一試薬の調整は、表４に抗ヒト S-AMY 抗体添加試薬の調整方法の手順を示した。なお、第二試薬は、JSCC AMY 常用基準法試薬をそのまま使用した。

５）測定結果

抗ヒト S-AMY 抗体を用いた S 型 AMY の阻害結果を表５，６に示した。その結果、A 社製 Tu88E8 IgG（メイン抗体）のみの添加で、既定（メーカーが推奨する終濃度）の終濃度（100.0 mg/L）に対して 0.1～４倍量を添加したところ、S 型 AMY の阻害率は 72.9～95.9 %であった。Tu66C7 IgG（サブ抗体）のみの添加で、既定の終濃度（10.0 mg/L）に対して 0.1～４倍量を添加したところ、S 型 AMY の阻害は確認できなかった。また、メイン抗体とサブ抗体を混合し添加したところ、既定の終濃度以上抗体を添加したときの阻害率は、いずれも 95 %以上であった。さらに、P 型 AMY の阻害について検討した結果、いずれの添加量においても影響を受けることなく測定できた。

同様に B 社製抗体についても測定した結果、MNH　AMY3（メイン抗体）のみの添加で、既定の終濃度（10.0 mg/L）に対して 0.1～４倍量を添加したところ、S 型 AMY の阻害率は 51.7～91.0 %であった。MNH AMY2（サブ抗体）のみの添加で、既定の終濃度（10.0 mg/L）に対して 0.1～４倍量を添加したところ、S 型 AMY の阻害率は、22.4～26.4 %であった。また、メイン抗体とサブ抗体を混合し添加したところ、既定の終濃度以上抗体を添加したときの阻害率は、いずれも 95 %以上であった。さらに、P 型 AMY の阻害について検討した結果、いずれの添加量においても影響を受けることなく測定できた。

表3　抗ヒトS-AMY抗体の添加系列および添加終濃度

(単位：mg/l)

	ロシュ社製抗体				アルフレッサ社製抗体			
添加量容量	ﾒｲﾝ抗体(mg/l)	ｻﾌﾞ抗体(mg/l)	ﾒｲﾝ固定(100mg/l)＋ｻﾌﾞ抗体	ｻﾌﾞ固定(10mg/l)＋ﾒｲﾝ抗体	ﾒｲﾝ抗体(mg/l)	ｻﾌﾞ抗体(mg/l)	ﾒｲﾝ固定(10mg/l)＋ﾒｲﾝ抗体	ｻﾌﾞ固定(10mg/l)＋ﾒｲﾝ抗体
4	400	40			40	40		
2	200	20	20	200	20	20	20	20
1	100	10	10		10	10	10	
0.9	90	9			9	9		
0.8	80	8			8	8		
0.7	70	7			7	7		
0.6	60	6			6	6		
0.5	50	5	5	50	5	5	5	5
0.4	40	4			4	4		
0.3	30	3			3	3		
0.2	20	2			2	2		
0.1	10	1	1	10	1	1	1	1
0	0				0			

ロシュ社製抗体　：Tu88E8 IgG（メイン抗体），Tu66C7 IgG（サブ抗体）

アルフレッサ社製抗体　：MNH AMY3（メイン抗体），MNH AMY2（サブ抗体）

表4　抗ヒトS-AMY抗体添加試薬の調整方法

R－1試薬調製法

1）メイン抗体，サブ抗体試薬調製方法

抗体量（倍率）	抗体液	JSCC試薬	最終液量
4.0	70	0	20
2.0	50	50	20
1.0	20	0	20
0.9	18	2	20
0.8	16	4	20
0.7	14	6	20
0.6	12	8	20
0.5	10	10	20
0.4	8	12	20
0.3	6	14	20
0.2	4	16	20
0.1	2	18	20
0.0	0	20	20

1）4倍濃度70mL調製　→　内20mLをそのまま4倍濃度で使用

↓

2）4倍濃度50mLをJSCC試薬50mLで希釈　→　内20mLをそのまま2倍濃度で使用

3）2倍濃度70mLをJSCC試薬70mLで希釈　→　内20mLをそのまま1倍濃度で使用

↓

4）1倍濃度120mLとJSCC試薬(90mL)で希釈系列を作製

JSCC試薬必要量	
(1)用	70
(2)用	50
(3)用	70
(4)用	90
Total	280

2）ﾒｲﾝ抗体＋ｻﾌﾞ抗体試薬調製方法

抗体量（倍率）	ｻﾌﾞ抗体液	希釈液	最終液量
2.0	35	0	20
1.0	15	15	20
0.5	10	10	16
0.1	4	16	20

1）JSCC試薬(80mL)にﾒｲﾝ抗体を規定量添加し、ｻﾌﾞ抗体液用(35mL)と希釈液用(45mL)に分取する。
2）ｻﾌﾞ抗体液用(35mL)に規定の2倍量のｻﾌﾞ抗体を添加　→　内20mLをそのまま2倍濃度で使用
3）2倍溶液の内15mLに希釈液用を15mL加えて混合する。→　内20mLを1倍濃度で使用
4）1倍溶液の内10mLに希釈駅用10mL加えて混合する。→　内16mLを0.5倍濃度で使用
5）0.5倍溶液4mLに希釈液16mLを加えて混合する

JSCC試薬必要量	
Total	80

3）ｻﾌﾞ抗体＋ﾒｲﾝ抗体試薬調製方法

抗体量（倍率）	ﾒｲﾝ抗体液	希釈液	最終液量
2.0	25	0	20
0.5	5	15	16
0.1	4	16	20

1）JSCC試薬(60mL)にｻﾌﾞ抗体を規定量添加し、ﾒｲﾝ抗体液用(25mL)と希釈液用(35mL)に分取する。
2）ﾒｲﾝ抗体液用(25mL)に規定の2倍量のﾒｲﾝ抗体を添加　→　内20mLをそのまま2倍濃度で使用
3）2倍溶液の内5mLに希釈液用を15mL加えて混合する。→　内16mLを0.5倍濃度で使用
4）0.5倍溶液4mLに希釈液16mLを加えて混合する

JSCC試薬必要量	
Total	60

⑤SOP試薬をそのまま使用（20mL）

R－2試薬

・同一のものを共有して下さい。（各5mL）

SOP試薬送付量	R-1	800mL
	R-2	180mL

表5　A社抗体の阻害率

ﾒｲﾝのみ添加(倍)	阻害率(%)	ｻﾌﾞのみ添加(倍)	阻害率(%)	ﾒｲﾝ＋ｻﾌﾞ(倍)	阻害率(%)
0	0				
4	95.9	4	-1.4	1.0+2.0	97.2
2	93.7	2	-0.4	1.0+1.0	96.1
1	89.6	1	0.1	1.0+0.5	93.9
0.9	88.8	0.9	-0.1	1.0+0.1	92.6
0.8	87.9	0.8	0		
0.7	86.9	0.7	-0.3	2.0+1.0	97.3
0.6	85.7	0.6	0.3	0.5+1.0	94.5
0.5	84.1	0.5	-0.3	0.1+1.0	91.8
0.4	82.3	0.4	0.3		
0.3	79.8	0.3	-0.4		
0.2	77.0	0.2	0.2		
0.1	72.9	0.1	0.1		

表6　B社抗体の阻害率

ﾒｲﾝのみ添加(倍)	阻害率(%)	ｻﾌﾞのみ添加(倍)	阻害率(%)	ﾒｲﾝ＋ｻﾌﾞ(倍)	阻害率(%)
0	0				
4	91.0	4	26.4	1.0+2.0	99.9
2	84.4	2	25.8	1.0+1.0	98.4
1	75.8	1	25.3	1.0+0.5	98.2
0.9	74.2	0.9	25.9	1.0+0.1	96.2
0.8	72.4	0.8	25.7		
0.7	71.0	0.7	25.2	2.0+1.0	98.8
0.6	68.9	0.6	24.7	0.5+1.0	97.9
0.5	66.5	0.5	24.9	0.1+1.0	95.1
0.4	63.7	0.4	24.1		
0.3	60.5	0.3	23.8		
0.2	56.7	0.2	22.4		
0.1	51.7	0.1			

6）考察

A 社製抗体，B 社製抗体ともメイン抗体のみでは、S 型 AMY を十分に阻害できないことが確認できた。また、A 社製サブ抗体のみでは、S 型 AMY を阻害することはできなかった。B 社製サブ抗体のみでは、抗体量を増加しても約 25 %の阻害であった。このことから、A 社，B 社ともメイン抗体とサブ抗体を組み合わせなければ S 型 AMY の阻害率を高められないことが確認できた。さらに、メイン抗体とサブ抗体を既定量以上添加することで、S 型 AMY の阻害率は 95 %以上となることが確認できた。

抗ヒト S-AMY 抗体の添加量は、A 社製 Tu88E8 IgG 抗体が 100 mg/L 以上，Tu66C7 IgG 抗体が 10 mg/L 以上必要で、B 社製 MNH AMY3 抗体が 10 mg/L 以上, MNH AMY2 抗体が 10 mg/L 以上必要である。これらを満たしていれば S 型 AMY は、95 %以上阻害できる。さらに標準物質の値付けには、その都度 S 型 AMY の阻害率を求め、P 型 AMY 活性値を補正すれば阻害率のばらつきを解消できると考える。

4-2-2　標準物質候補品を用いた反応性評価試験の共同実験

1）測定試料

反応性試験用試料は、JC･ERM（Lot 005）および検量用 ERM8種を用いた（表7）。また、精密さの確認および相関分析に用いる患者血清は、日常検査で依頼された患者血清 441 検体を用いた。

表7　測定試薬の基質と検量用 ERM

キット番号	基質名	検量用 ERM
対照	EtG7-PNP	JC･ERM（Lot005）
1	GalG2-CNP	トレースキャリブ
2	GalG2-CNP	酵素キャリブレータ
3	GalG2-CNP	キャリブーＥＥ
4	GalG2-CNP	酵素キャリブレータ
5	GalG2-CNP	酵素キャリブレータ
6	GalG4-CNP	酵素キャリブレータ
7	BG5-PNP	理論ファクター
8	BG5-PNP	酵素キャリブレータ
9	BG5-PNP	酵素キャリブレータ
10	BG5-PNP	酵素キャリブレータ
11	BG5-PNP	ｱｰﾙﾄｺﾝﾄﾛｰﾙ異常
12	EtG7-PNP	キャリブーＥＥ
13	EtG7-PNP	C-fas

2）測定装置

日立モジュラーアナリティクスを用いた。

3）検討試薬

反応性評価に用いた P-AMY の試薬は、JSCCAMY 常用法試薬に抗ヒト S-AMY 抗体を添加し調整した P-AMY 常用基準法案（自製試薬）を用いた。また、自動分析装置のパラメータは JSCC　AMY 常用基準法の測定条件に一致するよう設定して用いた。なお、検量は JC・ERM（Lot 005）を用い行った。

検討用試薬キットは表７に示したごとく P-AMY13 キットを用いた。なお、測定パラメータはメーカーの指示に従い、検量は指定の検量用 ERM を用いて測定した。

4）反応性評価

①精密さの確認

精密さの確認は、患者血清 50 検体を用いたランダマイズ２回測定の測定値から、分散分析による標準偏差の期待値（σ＾）を求めた。

②相関分析

相関分析用の患者血清 439 検体を用い、ｘ軸に JCCLS-SOP 法の測定値を、ｙ軸に JSCC 常用基準法案１，２および試薬キットの測定値をとり相関分析を行い、相関係数ｒ，回帰式ｙ＝ａ＋ｂｘおよび推定値の標準誤差Ｓy･x をそれぞれ求めた。

③反応性試験用試料の測定

各試験試料を５重測定し、その平均値および標準偏差 SD を求めた。次に測定試料の推定値，残差（平均値-推定値）および相対残差（残差／推定値×　100　%）を求めた。

④反応性の確認

試験試料の反応性の確認は、個々の Y の 95 %信頼区間を用いた残差の有意差検定法により行った。有意差検定は、試験試料の測定値（X_0，Y）が②項で求めた回帰式上の点（X_0，Y^）の予測区間に存在するか否かを確認した。

⑤相対残差の評価

各試料について相対残差を比較した。

5）結果（表８、９）

表８にランダマイズ２回測定による精密さの評価結果と JC・ERM の酵素反応性評価結果を示した。その結果、標準偏差の期待値σ＾の大きさは、0.61～1.14 U/L であった。JCCLS-SOP 法に対する各試薬の相関分析の結果は、相関係数ｒが 0.981～0.994，回帰式のｙ切片ａの大きさが-2.41～1.55 U/L，傾きｂが 0.86～1.34 であった。また、JC・ERM（Lot 005）の酵素反応性を JCCLS-SOP 法を対照とし各試薬について評価した結果、GalG2-CNP を基質とした５キットで 95 %信頼区間を用いた残差が-29.23～-21.54 U/L であり、相対残差の大きさは-16.73～15.06 %であった。他の基質（GalG4-CNP，BG5-PNP，EtG7-PNP）

では、95 %信頼区間を用いた残差が-4.21～2.11U/L であり、相対残差の大きさは-2.26～1.24 %であった。

6）考察

JC・ERM（Lot 005）の酵素反応性評価を行った結果、GalG2-CNP 基質を用いた試薬キットは、ヒト検体と酵素反応性が異なることが確認できた。また、JSCC 常用基準法案を含む他の試薬キットでは、JC・ERM の酵素反応性がヒト検体と同様であった。

JC・ERM の酵素反応性は、JSCC/JCCLS　AMY-SOP 法でも同様の結果が得られていることから、T-AMY と同じ取り扱いをすれば酵素標準物質として用いることができると思われる。

表8　JC･ERM(005)の酵素反応性評価結果

試料名		日本･常用酵素標準物質(005)															
キット番号	基質名	n=5			回帰式			推定値	残差	相対残差		95%信頼区間			総合評価	精密さ(n=50)	
		平均値	SD	n	r	a	b			%	評価	下限値	上限値	評価		Sy･x	σ^
	JCCLS(SOP)	165.8	0.88	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	1.01	0.76
	JSCC常用基準法案1	165.2	0.94	439	0.993	1.15	0.99	164.6	0.60	0.36	○	156.7	172.5	○	○	1.11	0.82
	JSCC常用基準法案2	167.0	0.67	439	0.993	-0.05	1.01	167.4	-0.48	-0.29	○	159.1	175.8	○	○	0.92	0.73
1	GalG2-CNP	151.5	1.23	439	0.986	0.54	1.07	178.3	-26.85	-15.06	×	165.9	190.7	×	×	1.04	0.77
2	GalG2-CNP	150.3	0.72	439	0.988	-0.37	1.07	177.7	-27.33	-15.38	×	166.1	189.2	×	×	1.03	0.83
3	GalG2-CNP	160.7	1.94	439	0.981	0.64	1.10	182.3	-21.54	-11.82	×	167.2	197.4	×	×	1.10	0.81
4	GalG2-CNP	140.5	1.08	439	0.985	0.89	1.01	168.7	-28.22	-16.73	×	156.5	181.0	×	×	0.87	0.64
5	GalG2-CNP	146.9	1.98	439	0.986	0.20	1.06	176.1	-29.23	-16.60	×	163.7	188.6	×	×	1.26	0.96
6	GalG4-CNP	176.6	1.29	439	0.992	-1.65	1.09	179.1	-2.53	-1.41	○	169.5	188.7	○	○	1.10	0.89
7	BG5-PNP	223.4	1.14	439	0.994	0.54	1.34	222.6	0.83	0.37	○	212.6	232.6	○	○	1.29	1.14
8	BG5-PNP	168.8	0.83	439	0.992	-0.46	1.01	167.3	1.52	0.91	○	158.5	176.0	○	○	0.74	0.61
9	BG5-PNP	171.5	1.35	439	0.991	-2.41	1.04	169.4	2.11	1.24	○	159.9	178.8	○	○	1.23	1.00
10	BG5-PNP	182.6	1.49	439	0.993	-0.88	1.13	186.8	-4.21	-2.26	○	177.3	196.3	○	○	1.29	1.01
11	BG5-PNP	163.8	1.70	439	0.994	-1.19	0.99	162.8	1.00	0.61	○	155.0	170.6	○	○	0.93	0.76
12	EtG7-PNP	141.6	1.78	439	0.987	-1.70	0.86	140.8	0.82	0.58	○	131.2	150.3	○	○	1.19	0.93
13	EtG7-PNP	165.2	0.93	439	0.991	1.55	0.97	163.2	1.98	1.22	○	153.9	172.5	○	○	0.93	0.76

相対残差：○:±5%以内,△:±10%以内,×:±11%以上
評価：○:±5%以内,×:±6%以上

表9　自社製検量用 ERM の反応性評価

キット No.	基質名	相対残差	95%信頼区間	総合評価
1	GalG2-CNP	×	×	×
2	GalG2-CNP	×	×	×
3	GalG2-CNP	△	○	×
4	GalG2-CNP	×	×	×
5	GalG2-CNP	×	×	×
6	GalG4-CNP	○	○	○
7	BG5-PNP			
8	BG5-PNP	○	○	○
9	BG5-PNP	○	○	○
10	BG5-PNP	○	○	○
11	BG5-PNP	○	○	○
12	EtG7-PNP	○	○	○
13	EtG7-PNP	○	○	○

相対残差：○:±5%以内,△:±10%以内,×:±11%以上
95%信頼区間の評価：○:±5%以内,×:±6%以上
総合評価：○：相対残差±5%以内，×：±6%以上

4-2-3　　S-AMY 阻害試験の普遍性試験および常用基準法（案）の施設間差

1）参加施設：用手法は、関東労災病院，筑波大学，ロシュ・ダイアグノステックス，アルフレッサ・ファーマおよび和光純薬の５社。自動化法は、６機種（日立 7070 ２台，日立 7170　2 台，日立 7180 および東芝 TBA-80FR Neo）。

2）実施内容：S-AMY 阻害率の普遍性試験，施設間差の確認および JC・ERM（Lot　005 の値付け。

3）実施方法：別紙の PAMY 阻害試験プロトコル参照。

4）阻害率の算出方法と除外条件：

ａ．算出方法

以下の計算で S-AMY、P-AMY の阻害率を算出する。

阻害率（%）＝（T-AMY-測定値） /T-AMY×100

ｂ．除外条件

以下の条件を満たすことが前提である。

S- AMY の阻害率として 95.0 %以上を有すること

P- AMY の阻害率として 2 %以内であること

5）結果

用手法における S-AMY 阻害試験と JC・ERM の値付け試験の結果を表 10 に、自動化法の結果を表 11 に示した。

a．S-AMY 阻害試験の普遍性：得られた結果より、用手法における各施設の S-AMY 阻害率は、A 社抗体を用いたとき 95.3～98.3 %で平均 96.5 %であった。また、B 社抗体を用いたときの阻害率は、96.1～98.6 %で平均 97.4 %であった。同様に自動化法では、A社抗体を用いたとき 95.7～98.5 %で平均 96.7 %であり、B社抗体を用いたとき 96.7～98.4 %で平均 97.4 %であった。

b．JC・ERM の値付け：用手法による値付けの結果、A 社抗体では 154.4～162.0 U/L で、B 社抗体では 154.2～161.2 U/L であった。

6）考察

S-AMY 阻害試験の普遍性試験は､用手法, 自動化法とも平均阻害率でA社抗体が 96.5 %, 96.7 %であり差は認められなかった。B 社抗体も同様に 97.4 %, であった。

両抗体の差はわずかであり、同等の S-AMY 阻害性能を有していることが確認できた。

JC・ERM の値付けは、S-AMY 阻害率を補正しているため、両抗体の活性値に差は認められなかった。また、用手法と自動化法を比較すると 5 U/L ほど自動化法が高値となったが、この原因は、用手法（ε405＝1012 m^2/mol）と自動化法（JC・ERM Lot 005 校正）の校正の差によると考えられた。

5．実試料標準物質の作成プロトコル

5-1　トレーサビリティ連鎖

血清膵型アミラーゼ活性測定におけるトレーサビリティ連鎖を図１に示した。

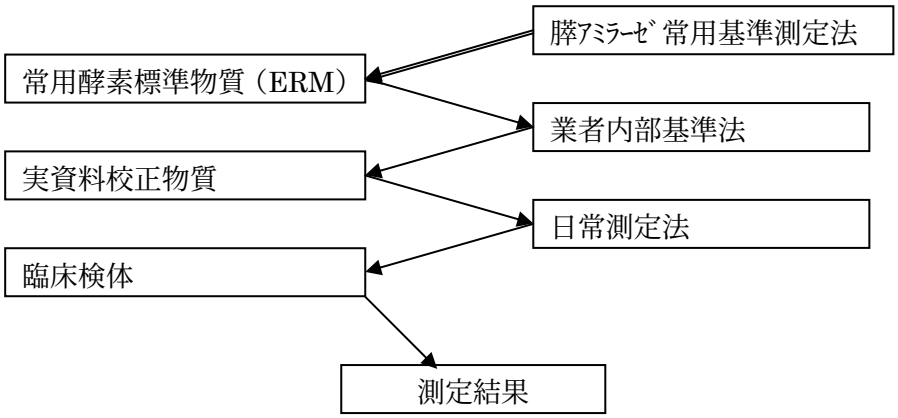


図１．膵アミラーゼ測定のトレーサビリティ連鎖

5-2　試料の性状規格

酵素反応性評価の結果、JC・ERM は膵型 AMY の酵素反応性が T-AMY と同様の反応性で有ったため、T-AMY と同様の使用方法を用いれば常用酵素標準物質として使用できる。

5-3　値付けの方法

JC・ERM の値付けは、図１に示したトレーサビリティ連鎖に従って、標準物質の値付けを行う。予め求めた阻害率から以下の計算で補正した値とする。

Pa：最終的に求める JC・ERM の P-AMY 活性量

Pv：本操作法により求められた JC・ERM の P-AMY 活性測定値

Ta：JC・ERM の T-AMY 活性量

Tv：JSCC 勧告法により求められた JC・ERM の総アミラーゼ活性測定値

K：本操作法により求められた S-AMY の阻害率

Pa＝［Pv-（ 1- K）×Ta］/K

Ta ＝Tv とする

Pa＝［Pv-（ 1- K）×Tv］/K

上記式は以下の式より導き出される。

Sa：JC・ERM の S-AMY 活性値

Ta：JC・ERM の T-AMY 活性値

Pv＝Pa＋Sa×（1―K）

＝Pa＋（Ta- Pa）×（1- K）

Ta＝Tv とする

Pv＝Pa＋（Tv- Pa）×（1- /K）

Pa＝［Pv-（ 1- K）×Tv］K

5-4　基準範囲の設定

総合健診受診者 2,574 例（男性：2,048 例，女性：526 例）を用いた。平均年齢は，男性 48.9 歳，女性 50.4 歳，全体では 49.2 歳であった。除外基準を適用後に残った 576 例（男性：461 例，女性：115 例）でノンパラメトリック法により算出した。

その結果，JSCC 常用基準法自動化法（案）での基準範囲は、16～52 U/L となった。

5-5　今後の課題

血清膵型 AMY 常用基準法の測定操作法を文書化する。

2-2-3-１３　血清　　C 反応性蛋白（CRP）

要旨

１）ヒト CRP 遺伝子を大腸菌に組み込み、リコンビナントヒト CRP（ｒCRP）を作製し、高品質の CRP 供給体制を確立した。

２）ｒCRP の物理化学的性質は天然の血清ヒト CRP と同等であった。

３）ｒCRP を用いてヒト CRP の常用参照標準物質および実用標準物質を作製した。

４）常用参照標準物質および実用標準物質の候補品の標準物質としての性能を評価した結果、両候補品とも十分な性能を有していることが確認された。

５）常用参照標準物質および実用標準物質の規格を作成し、候補品を評価の結果、両者とも規格を満たしていた。

６）CRM470 を基準に作成されている各社標準物質によりキャリブレーションを行い患者血清を測定した場合の相関係数は r=0.998～1.000、CRP 標準物質候補品を用いてによりキャリブレーションを行って患者血清を測定した場合の相関係数は r=0.998～1.000 と、CRM470 の結果を得られることが確認できた。

１．目的

血清 CRP の測定は世界的に国際蛋白標準物質 CRM470 を標準物質とした測定体系が確立されつつある。しかし、CRM470 はその表示値設定において、プール血清に精製 CRP を添加し、WHO 標準品および CDC US NRP を基準として免疫比濁法、免疫ネフェロメトリー法、免疫拡散法の平均値によって設定されている。これは、WHO 標準品やアメリカ合衆国標準品から表示値の移行が適切になされてはいるものの、正確性の側面から鑑みると必ずしも充分な設定値であるとは言えない。特に低濃度域をカバーできる測定キットが普及してきた現在では、正確性の高い標準物質の供給が望まれている。

国内において遺伝子組換え技術により r-CRP の製造技術が確立され、高純度・高品質 r-CRP の安定供給が可能となった。この r-CRP を用いて SI 単位へのトレーサビリティ連鎖測定体系を確立することを目的とする。

２．委員会の構成

藤田　孝（藤田保健衛生大学病院）
伊藤喜久（旭川医科大学）
長村洋一（藤田保健衛生大学）
中尾義喜（オリエンタル酵母工業㈱）
高田　卯（オリエンタル酵母工業㈱）
中根生弥（厚生連加茂病院）
山内昭浩（東海市民病院）
佐野俊一（愛知医科大学病院）

吉海　毅（ロシュ・ダイアグノスティックス㈱）
斉藤憲祐（デイドベーリング㈱）
佐藤悦子（(株)三菱化学ヤトロン）
北川文彦（藤田保健衛生大学病院）

３．委員会の開催

委員会としての開催は行っていない。必要に応じ電子メールにて討議を実施した。

４．標準物質の設定概要

ｒCRP の物理化学的性質、常用参照標準物質および実用標準物質の基本的性能については本研究 2005 年度および 2006 年度報告書に記載したので、本項ではヒト CRP 実用標準物質候補品の評価について記した。

４－１実験計画書

①「値付け」

候補となる試料は CRM470 を基準物質として、暫定的に汎用自動分析装置をい日東紡績（株）の N-アッセイ LA CRP-S およびデイドベーリングの BNⅡを用いて施する。

また、常用参照標準物質の値付けはアミノ酸分析―同位体希釈質量分析法（本誌２－２－３項参照）で実施した。

②「コミュータビリティ」およびキャリブレーション効果の確認

基準測定法を日東紡績（株）製キットＮアッセイ　ＬＡ　ＣＲＰ-Ｓ（ニットーボー社）とし、5 社キットとの相関を、血清検体 50 以上を用いて求める。このとき、候補品である CRP 標準物質および CRM470 も同時に測定する。

③安定性試験

冷蔵状態で保存を行っている候補品について、１ヶ月毎にラテックス比濁法で測を行い、安定性を確認する。

４－２共同実験

４－２－１測定試料

オリエンタル酵母工業㈱にて作成した CRP 標準物質候補品およびオンフォームドコンセントにより同意の得られた患者血清。

4－2－2測定方法

①「値付け」

完成された候補品に対し、オリエンタル酵母工業㈱においてデイドベーリングの BNⅡで値付けをおこなった。

②「コミュータビリティ」およびキャリブレーション効果の確認

基準測定法をNアッセイ LA CRP-S（ニットーボー）とし、ナノピア CRP（第一化学)、CRP ラテックス（Ⅱ）x2（デンカ生研)、イアトロ CRP-EX、イアトロ CRP（TIA）（ともに三菱化学ヤトロン)、デタミナーT CRP（協和メデックス）の 5 製品について n=60 で相関を確認した。

③安定性試験

平成18年11月に完成した候補品を１ヶ月ごとにラテックス比濁法および免疫比濁法で安定性を確認した。

4－2－3測定結果

①「値付け」

・ 常用参照標準物質

基準法であるアミノ酸分析―同位体希釈質量分析法（LC-ID/MS）で測定した結果、0.915 **±** **0.04** mg/mL であった（2－3－3項参照） 。この値は規格 1.0 **±** 0.2 mg/mL の規格を満たしていた。

・ 実用標準物質

デイドベーリングの BNⅡで値付けを行った結果、5.2 mg/dL であった（別紙参照)。

この値も規格を満たしていた。

②「コミュータビリティ」およびキャリブレーション効果の確認

各社指定の標準物質により、キャリブレーションを実施し、CRM470 および CRP 実用標準物質候補品を測定した結果、それぞれ、3.79～4.20 mg/dL、4.97～5.22 mg/dL であった。

暫定基準測定法をNアッセイ　LA　CRP-S（ニットーボー）とし、ナノピアCRP（第一化学)、CRPラテックス（Ⅱ）x2（デンカ生研)、イアトロCRP-EX、イアトロCRP（TIA)（ともに三菱化学ヤトロン)、デタミナーT CRP（協和メデックス）の5製品についてn=60で相関を確認した結果、相関係数はr=0.998～1.000、傾きは1.000～1.094、切片は-0.279～0.089であった（表１)。

表１　各社補正物質による測定値の相関

相関	A	B	C	D	E	F
A	********	0.998	1.000	1.000	0.999	1.000
B	0.998	********	0.998	0.998	0.997	0.998
C	1.000	0.998	********	1.000	0.999	0.999
D	1.000	0.998	1.000	********	0.999	0.999
E	0.999	0.997	0.999	0.999	********	0.999
F	1.000	0.998	0.999	0.999	0.999	********

傾き	A	B	C	D	E	F
A	********	1.094	1.001	1.037	1.000	1.050
B	1.094	********	0.912	0.944	0.911	0.956
C	1.001	0.912	********	1.036	0.999	1.049
D	1.037	0.944	1.036	********	0.964	0.964
E	1.000	0.911	0.999	0.964	********	1.048
F	1.050	0.956	1.049	0.964	1.048	********

切片	A	B	C	D	E	F
A	********	-0.279	0.048	-0.075	0.089	-0.034
B	-0.279	********	0.308	0.197	0.347	0.236
C	0.048	0.308	********	-0.122	0.043	-0.079
D	-0.075	0.197	-0.122	********	0.160	0.160
E	0.089	0.347	0.043	0.160	********	-0.118
F	-0.034	0.236	-0.079	0.160	-0.118	********

各社測定試薬をCRP標準物質候補品によりキャリブレーションを実施し患者血清を測定した結果、相関係数はr=0.998～1.000、傾きは0.953～1.035、切片は-0.010～0.086であった（表２)。更に、患者検体の測定値のばらつきを計算したところ、全ての試薬においてメーカー指定品でキャリブレーションした場合に比べ、CRP標準物質候補品でキャリブレーションした場合の方がCV %は小さくなった（表３)。

表２　実用標準物質による補正をした場合の各社測定試薬間の相関

相関	A	B	C	D	E
A	********	1.000	1.000	0.998	0.999
B	1.000	********	1.000	0.998	0.999
C	1.000	1.000	********	0.998	0.999
D	0.998	0.998	0.998	********	0.999
E	0.999	0.999	0.999	0.999	********

傾き	A	B	C	D	E
A	********	1.021	1.035	0.990	0.986
B	1.021	********	1.013	0.969	0.966
C	1.035	1.013	********	0.957	0.953
D	0.990	0.969	0.957	********	0.994
E	0.986	0.966	0.953	0.994	********

切片	A	B	C	D	E
A	********	0.016	0.021	0.086	0.073
B	0.016	********	0.004	0.069	0.056
C	0.021	0.004	********	0.064	0.051
D	0.086	0.069	0.064	********	-0.010
E	0.073	0.056	0.051	-0.010	********

表３　補正物質をメーカー添付物質あるいは実用標準物質候補品とした場合の測定値の CV 値

CV%	A	B	C	D	E
メーカー指定品	89.7	88.2	92.8	98.5	95.1
候補品	87.1	87.8	88.0	90.8	90.2

③安定性試験

平成 18 年 11 月に完成した候補品を１ヶ月ごとにNアッセイ　LA　CRP-S（ニットーボー）で安定性を確認した結果、12 ヶ月の平均値は 5.14 mg/dL、CV %は 2.15 %と安定性が確認された（図１）。

５．標準物質の作製プロトコル

５-１．トレーサビリティ連鎖

本研究において常用参照標準物質、実用標準物質および基準測定法、常用基準測定法を設定することによりヒト血清 CRP 測定のトレーサビリティ連鎖を完成させた（図２）。今後、SI 単位系へのトレーサビリティを推進させたい。

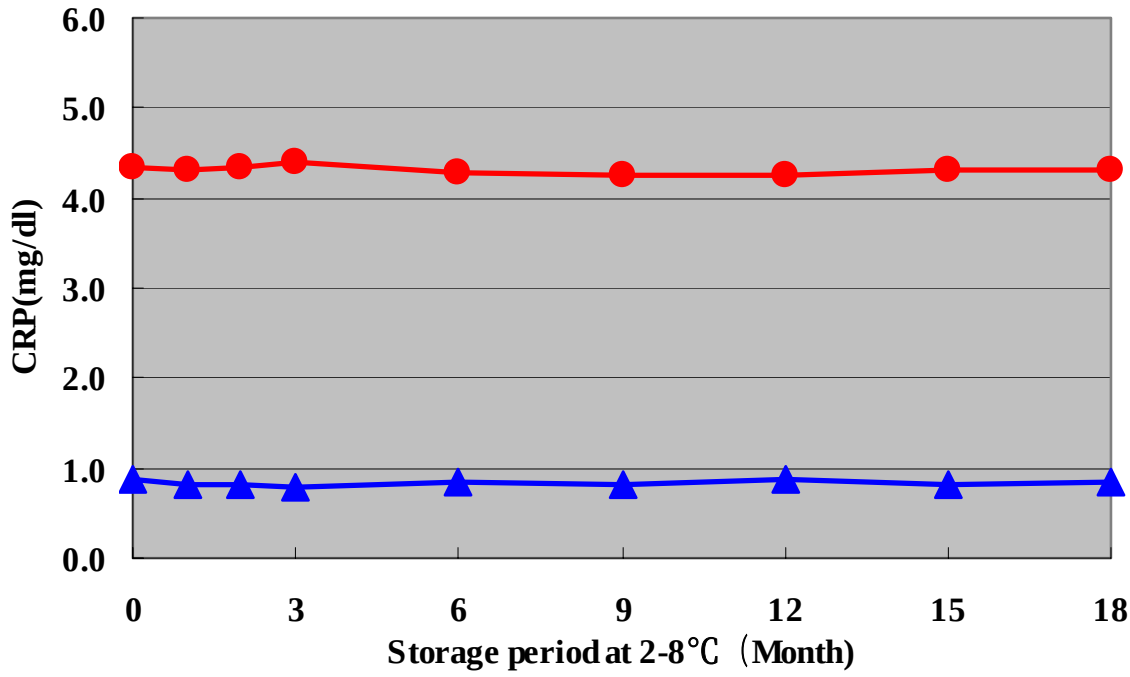


図１．保存安定性

▲：常用参照標準物質、●：実用標準物質

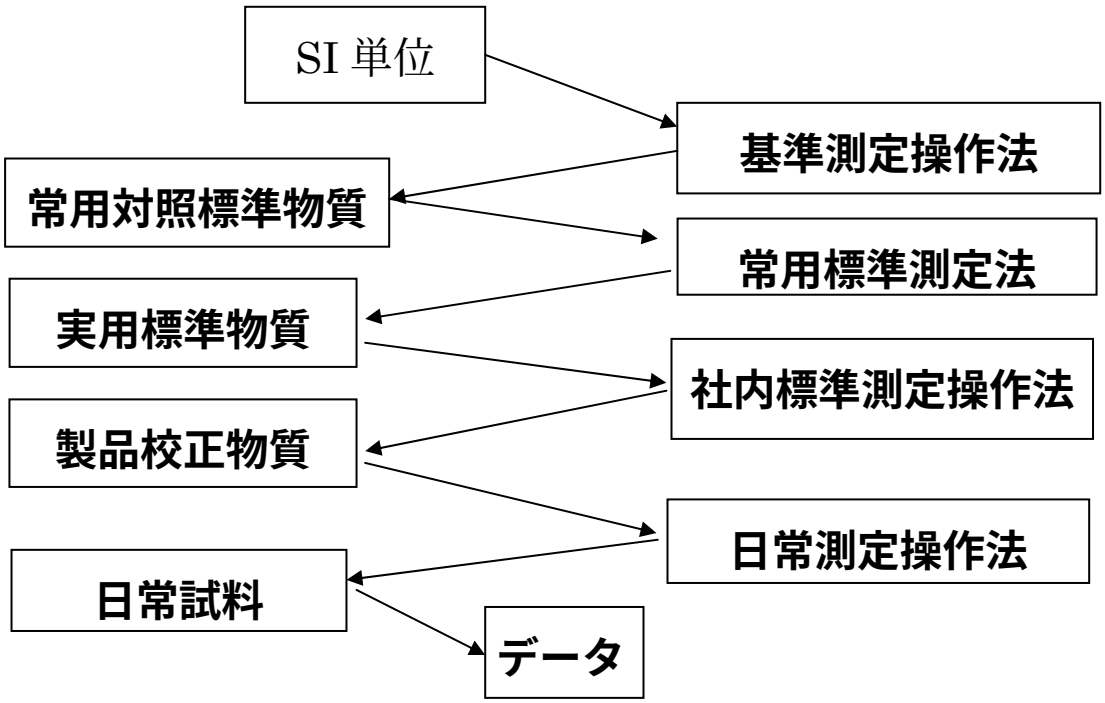


図２．　ヒト血清 CRP 測定のトレーサビリティ連鎖

5-1試料の性状と規格

5-1-1．標準物質の組成

①常用参照標準物質

rCRP 1 mg/mL になるように 0.14 M NaCl, 2 mM $CaCl_2$ and 0.05 % NaCl を含む 20 mM Tris-HCl(pH7.5)で溶解する。

②実用標準物質

ヒト血清に rCRP 濃度 4.5 mg/dL になるように溶解した後、凍結乾燥する。使用時、正確に純粋 1.0 mL にて溶解して使用する。

5-1-2．性状規格

常用参照標準物質および実用標準物質の品質規格を表４、表５に示すとおり設定した。そして、候補品を評価した結果、両者とも規格を満たしていた。

表４． CRP￥常用参照標準物質性状規格

項　　目	規　　格	確　　認　　値
1．適用範囲	本品はヒトの血清中ＣＲＰを測定する場合の常用参照標準物質として使用することを目的とする。	
2．　原料		
2-1．起源	組換えヒト CRP を起源とする。	
2-2．　基材	Tris buffer	規格に従う／適合
2-3．添加剤	安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
2-4．感染物質	なし	
3．特性		
3-1．形状	液状品	適合
3-2．包装	ガラスバイアル（１mL）	適合
3-3．　反応性	ヒト CRP と同様な挙動を示す。	適合／反応性試験にて確認
3-4．物理学的性質		
3-4-1．分子量	SDS-PAGE で 23 kDa である。	適合
3-4-2．純度	SDS-PAGE で単一バンドである。	適合
3-5．安定性		
3-5-1．開封前の安定性	２年（10 ℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
3-5-2．開封後の安定性	10 時間（10 ℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認

3-6．均一性	①　10 バイアルの３回反復測定を行う時、バイアル間差は±２　%以内である。 ②　不確かさを表記する。	適合
4．CRP 濃度	1.0±0.2　mg/mL とする。	0.915　mg/mL/ 適合

表５． CRP 実用標準物質性状規格

項　　目	規　　格	確　　認　　値
１．適用範囲	本品はヒトの血清中 CRP を測定する場合の実用標準物質として使用することを目的とする。	
２．　原料		
２-１．起源	組換えヒト CRP を起源とする。	
２-２．　基材	ヒト血清	規格に従う／適合
２-３．添加剤	安定化剤を添加する。	規格に従う／適合
２-４．感染物質	HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1，２抗体の試験で陰性であること。陰性であっても感染性物質として取扱う。	HBs 抗原、HCV 抗体、HIV-1，２抗体の試験で陰性／適合
３．特性		
３-１．形状	凍結乾燥品（１mL 用）	適合
３-２．包装	ガラスバイアル	適合
３-３．　反応性	ヒト CRP と同様な挙動を示す。	適合/反応性試験にて確認
３-４．物理学的性質		
３-４-１．分子量	SDS-PAGE で 23 kDa である。	適合
３-４-２．純度	SDS-PAGE で単一バンドである。	適合
３-５．安定性		
３-５-１．開封前の安定性	２年（10 ℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
３-５-２．開封後の安定性	10 時間（10 ℃以下の冷蔵保存）	保存安定性試験にて確認
３-６．均一性	①　10 バイアルの３回反復測定を行う時、バイアル間差は±２ %以内である。 ②　不確かさを表記する。	適合
４．ＣＲＰ濃度	50 ± 5　mg/mL とする。	52　mg/mL / 適合

５-２値付けの方法

本研究を実施した時点においては上位標準物質である常用参照標準物質の値付けが完成していなかったため、実用標準物質の値付けは暫定的に国際標準物質である CRM470 を基準物質として、

デイドベーリングの BNⅡを用いて実施した。

６．今後の課題

多くの測定施設による普遍性試験を実施の上、その結果および本研究の成果を論文発表するとともに、日本臨床化学会および JCCLS 認証を得てわが国における CRP 標準物質とするとともに、国際的標準物質として JCTLM, IFCC などに申請する。そのためのデータ収集の作業が今後の課題である。

７．結び

オリエンタル酵母工業㈱で試作していただいた CRP 標準物質候補品について、その基本性能を確認した。その結果、患者血清を測定した場合に CRM470 と同等の相関、回帰式を得ることが確認でき、CRM470 に代る標準物質となり得る可能性が示唆された。

2-2-3-14　リパーゼ

要旨

1）日本臨床化学会リパーゼプロジェクト委員会では、血清リパーゼ活性測定の標準化を目的として、JSCC 常用基準法を設定するための作業を行い、JSCC 常用基準法（案）を準備することができた。そこで、本常用基準法（案）を用いて、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）とヒト血清との反応性試験を行った結果、JC-ERM はヒト血清との反応性が異なった。

2）この原因を究明するため、ヒト血清の反応タイムコースを調べた結果、検体と試薬の反応過程において、白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がることが確認された。そこで、この現象を回避するために、第一試薬にも硫酸マグネシウムを添加し、第一反応でグリセロールを消去する方法に、JSCC 常用基準法（案）を改良した。

3）そこで、今回、この改良 JSCC 常用基準法（案）を用いて、再度、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）とヒト血清との反応性試験および酵素標準物質の標準値の値付けを行うための普遍性試験を行った。

4）その結果、JC-ERM とヒト血清の反応性は、相対残差で最大 13 %以内で一致することが確認できた。しかし、普遍性試験では、この改良 JSCC 常用基準法（案）においても、ヒトプール検体で白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がる検体が認められた。そこで、この原因を究明することが、今後の課題となった。

1.目的

現在､日常検査に用いられている血清リパーゼ活性測定法は､カラーレート法が主流であるが､その他に BALB-DTNB 法、比濁法、カラーレート法、EIA などが市販されている。その活性値は最大で約 2 倍の差があり、測定キットにより、乖離検体が認められている。

そこで、本プロジェクトでは、測定法間差や施設間差を縮小し、データの共有化を行うことを目的に、基準となる JSCC 常用基準法を設定するための活動を行ってきた。その結果、常用基準法（案）を準備することが出来た。

しかし、本基準法（案）では、検体と試薬の反応過程において、白濁が生じて反応タイムコースがやや曲がることが確認された。

そこで、今回は、第一試薬にも硫酸マグネシウムを添加した改良 JSCC 常用基準法（案）と市販の日常検査用試薬キットを用いて、標準物質候補品の酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）の反応性試験および酵素標準物質の標準値に値付けするための普遍性試験を行った。

2.委員会の構成

本研究を迅速に達成するために研究構成員を選出し、実験を行った（資料 1)。

資料１　P-AMY、リパーゼ合同検討委員会の構成員

氏　　名	所　属
白井秀明	（独）労働者健康福祉機構関東労災病院検査科
桑　克彦	筑波大学医学臨床系
関口光夫	元日本大学板橋病院臨床検査部
大澤　進	九州大学医学部保健学科
細萱　茂美	山梨大学医学部附属病院検査部
飯塚　儀明	筑波大学附属病院検査部
芳賀　利一	三井記念病院中央検査部
加藤　隆則	㈱日立製作所　日立健康管理センタ
斉藤　友幸	筑西市民病院臨床検査科
大貫　経一	栃木病院臨床検査科

3.委員会の開催

下記のとおり委員会を開催し、本研究の実施方法について検討した（資料 2)。

１．日　時：平成 19 年 6 月 24 日（日）

２．場　所：第一化学薬品株式会社　本社８階会議室

３．議　題：

(1) これまでの実験経過報告について

(2) 臨床化学会夏期セミナーの報告事項について

(3) 今後の活動内容について

(4)その他

資料２　　第７回 P-AMY・Lipase プロジェクト合同委員会の議事録

1.日　時：平成 19 年 6 月 24 日（日）10：00～12：00
2.場　所：第一化学薬品（株）本社（東京）8 階会議室
出席者：白井、飯塚、関口、芳賀、加藤、足立、大和、野村、酒瀬川、山口、新井、今村、
　　黒谷、鈴木
1.議　題
Ⅰ.リパーゼについて
　1）実験経過報告
（1）今までの実験結果が報告された。
　・共同実験の結果、常用基準法（案）の精密性に問題があった。
　・　JC・ERM の酵素反応性が常用基準法（案）と市販キットで異なる結果となった。
　・　ヘパリン静注試験の結果、常用基準法（案）は LPL（ﾘﾎﾟﾌﾟﾛﾃｲﾝﾘﾊﾟｰｾﾞ）や HPL（肝ﾘﾊﾟｰｾﾞ）の影響を受けた。
（2）常用基準法（案）の最終反応系を NADPH から H_2O_2 に変更した結果が報告された。
　・精密性については、反応系を変えても改善されなかった。
　・JC・ERM の酵素反応性は、若干改善され、95%信頼区間に全てのキットが入ったが、相対残差は-2.2～-9.0%であり、１キットを除き±５%以内にはならなかった。
（3）今後の課題が検討された。
　・　酵素反応性については、新常用基準法（案）で患者検体数を増やし確認することとなった。
　・特異性については、LPL や HPL に影響される範囲を求めることとした。
　・再実験の計画は、委員長と旭化成で調整することになった。

2）夏期セミナーの報告について
（1）これまでの実験経過と議論した内容について報告することとなった。

Ⅱ．P-AMY について
1）実験経過報告
(1)今までの実験報告の総括を行った。
(2)S-AMY 阻害率は、今までの実験結果より、２種類の抗体とも 95%以上の阻害率を示すことより、95%以上の阻害率で有れば抗体の指定はしないこととなった。
(3)JC・ERM の値付けは、S-AMY の阻害率を補正して行うこととした。なお、常用基準法の操作手順書には、試薬の調整方法, 阻害率の求め方等を明記することになった。
(4)P-AMY 活性の阻害率が±５%以上の場合は、調整した試薬を使用しないこととなった。
(5)用手法での普遍性確認試験を実施することとなった。

4.反応性試験

4-1 反応試験計画書

標準物質候補品を用いた反応性試験の実施計画書は、資料 3 のとおりである。

資料 3　　反応評価試験実施計画書

１．目　　的：改良リパーゼ常用基準法（案）と市販測定キットを用い、リパーゼ ERM 候補品と多数の患者血清を測定し、ERM 候補（JC-ERM）の反応性について調べること。

２．実施月日：平成 19 年 11 月 6 日（金

３．実施場所：旭化成ファーマ（株）

４．実施内容：

１）精密さの確認：ランダマイズ２回測定（50 件×2＝100 件）

２）相関分析：(1) リパーゼ、P-AMY 常用基準法（案）X軸

：各社市販キット　Y軸

(2) 患者血清：約 200 件

(3) 各社のキャリブレーター、管理物質およびリパーゼ、P-AMY 測定用 ERM 候補品（JC-ERM　Lot 005）：各 5 重測定

５．有意差検定

１） 管理物質の個々の Y の 95 %信頼区間を用いる方法

２） 相対残差の 100±5 %を用いる方法

4-2 検討試料

相関用試料は、当院検査部に検査依頼のあった患者血清（186 件）を使用した。患者血清との反応性評価用試料は、酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）を用いた。

4-3 測定方法

4-3-1 測定装置

日立 7080 自動分析装置を用いた。なお測定ダイアグラムは、(1) 反応性評価法（JSCC 自動化法）：改良 JSCC 常用基準法（案）に従い、検量は実測Kファクターを算出して実施した。(2) 検討法：試薬メーカーの標準的な操作法に従い、検量は各社指定の検量物質をそれぞれ用いて実施した。なお、改良 JSCC 常用基準法（案）の測定原理、試薬調製方法および測定操作法は、資料 4、5、6 とおりである。

資料4　　LIP測定原理

1,2-Diolein + H_2O ⟶ (DOC, Ca, Colipase) Monoolein + Oleic acid

Monoolein + H_2O ⟶ (Monoglyceride lipase) Glycerol + Oleic acid

Glycerol + ATP ⟶ (Glycerol kinase) L-α-Glycerophosphate + ADP

ADP + D-Glucose ⟶ (ADP hexokinase) D-Glucose-6-phosphate + AMP

D-Glucose-6-phosphate + $NADP^+$ ⟶ (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) D-Glucono-δlactone-6-phosphate + NADPH + H^+

上記反応により生成される還元型NADPの３４０ nmにおける増加速度を測定する。

資料5　LIP活性測定試薬調製方法

保存試薬Ⅰ

1) Bicine粉末2.45 gを秤量し約80mLの精製水を加え完全に溶解させた後、室温でpHを計測しながら5NNaOHでpHを8.0に調製する。
2) 硫酸マグネシウム49 mgを秤量し1) に添加溶解させる。
3) 塩化カルシウム33 mgを秤量し2) に添加溶解させ、次いで207 mgのATP粉末を秤量し2) に添加溶解させ、更に287 mgのNADP粉末、68 mgのグルコース粉末を秤量し添加溶解させる。
4) デオキシコール酸ナトリウム584 mgを秤量し3) に添加し溶解させる。
5) 500 U/mLになるように溶解したモノグリセリドリパーゼ0.6 mL、500 U/mLになるよう溶解したグリセロキナーゼ0.6 mL、500 U/mLになるように溶解したADP-HK 0.6 mL、500 U/mLになるように溶解したグルコース6リン酸デヒドロゲナーゼ0.6を添加混合する。更に5 mg/mLになるように調製したコリパーゼ溶液0.2 mLを添加する。
（これら5種類の粉末は予め精製水に溶解させる）
6) 30 ℃でpHを計測しながら5NNaOHでpHを8.15に調整した後、精製水で100 mLにメスアップする。
7) 0～4 ℃で保存する。

保存試薬Ⅱ

A) ジオレイン溶解液の調製方法

1) 100 mL容ビーカーに1.2 gのポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル（液状）を秤量し、泡立てないよう精製水約80 mlを加えスターラーでゆっくり攪拌して溶解させる。
2) MES粉末53 mgを秤量し1) に溶解させる。
3) 精製水で100 mLにメスアップする。

B)基質の調製方法

1) 100 mL容ビーカーに434 mgのジオレイン（液状）を秤量する。
2) 上記A)液50 mLを添加し37 ℃で4時間スターラーで泡立たない程度強く攪拌する。
3) 氷中に2時間以上静置する。

保存試薬Ⅱの調製方法

1) 約30 mLの精製水に24.6 mgの硫酸マグネシウムを添加溶解させる。
3) 前記B) 液6.4 mLを添加混合し精製水で50 mLにメスアップする。
4) 0～4 ℃で保存する。

資料6　　測定操作法および試薬組成

【用手法】
測定操作法は表1に示した。
1) 保存試薬 I 1.6 mLを試験管に分注する。検体0.1 mLと保存試薬 II を2：1を混合し冷蔵に保存する。
2) 検体0.1 mLを試験管に添加し混合した後、37 ℃の恒温水槽で加温する。
3) 空の石英セルを予め37 ℃の恒温セルホルダーに入れ保温しておく。
4) 予め37 ℃に加温しておいた試薬 II 0.8 mLを上記2) の試験管に添加し混合する。
5) 石英セルに4) の試薬を移し3.5分から5分間の340 nmにおける吸光度を測定し1分間あたりの吸光度の増加速
(mAbs1/min)を測定する。
ブランクは検体の代わりに生理食塩水を用いて同様の操作により340 nmの吸光度増加速度
を測定する (mAbs2/min) 。

表1　測定操作法

試薬名	使用量
試薬 I	1.6 mL
検体	0.1 mL
37 ℃で5分間加温	
試薬 II	0.8 mL

表2 保存試薬組成

保存試薬 I	試薬 I 中濃度	終濃度
Bicine-NaOH緩衝液 (pH8.15)	150 mM	100 mM
$MgSO_4$	2 mM	2 mM
$CaCl_2$	2.25 mM	1.5 mM
ATP	3.75 mM	2.5 mM
NADP	3.75 mM	2.5 mM
Glucose	3.75 mM	2.5 M
DOC	13.5 mM	9 mM
CoLipase	10 ug/mL	6.7 ug/mL
Monoglyceride lipase	1.5 U/mL	1 U/mL
Glycerol kinase	1.5 U/mL	1 U/mL
ADP-hexokinase	1.5 U/mL	1 U/mL
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	1.5 U/mL	1 U/mL
保存試薬 II	**試薬 II 中濃度**	**R2濃度**
Diolein	1.8 mM	0.6 mM
$MgSO_4$	2 mM	2 mM

計算式

$$\text{LIP活性 (U/L)} = \frac{\text{mAbs1/min} - \text{mAbs2/min}}{6.3\times10^{3}\times0.1} \times 2.5\times10^{3}$$

【自動化法】　　H7080のケース

試薬 I ：160 uL　　試薬 II ：80 uL
検体：10 u
主波長：340 nm
副波長：405 nm
反応温度：37 ℃
測光ポイント　27-31

計算式 (最終的にはKファクター使用)

$$\text{LIP活性 (U/L)} = \frac{\text{mAbs/min}}{6.3\times10^{3}\times0.01} \times 0.25\times10^{3}$$

4-3-2 検討試薬

1）反応性評価用試薬

改良 JSCC 自動化法（案）を用いた。なお本法の試薬調製は、改良 JSCC 常用基準法(案)による標準操作法案（JSCC-SOP 案）に従って自製した。

2）検討用試薬

以下に示した 4 社の 5 試薬キットを用い、試薬調製および検量は、各試薬メーカーの指示どおりに行った。

（1）カイノスオートシリーズリパーゼ試薬（KN:カイノス社製)、(2）リパーゼカラーオートテストワコー（WK:和光純薬社製)、(3）ネスコート VN リパーゼ(AR-VL：アルフレッサファーマ社製)、（4）ネスコート VLⅡLIP(AL-VN:アルフレッサファーマ社製)、(5）リキテックリパーゼ・カラー（RD:ロシュ・ダイアグノスティックス社製）

4-3-3 評価方法

1）精密さの評価

患者血清 50 件を用いたランダマイズ 2 回測定法で、標準偏差の期待値（σ＾）をそれぞれ求めた。

2）反応性評価法との相関

改良 JSCC 自動化法（案）と検討用試薬による測定値の比較は、197 件の患者血清を用いて回帰分析により、相関係数（ｒ）、回帰式 y=a+bx を算出し、乖離検体の有無を確認した。

3）反応性の評価

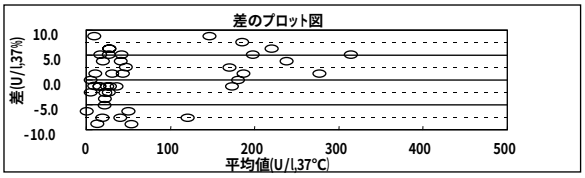
改良 JSCC 自動化法（案）と検討用試薬による JC-ERM の反応性評価は、まず 2）項で求めた相関分析の結果と JC-ERM をそれぞれ 5 重測定した結果から、試薬キット毎に相対残差と個々の Y の 95 %信頼区間を算出した。

4-4 測定結果

4-4-1 精密さの評価

ランダマイズ 2 回測定による検討結果を図 1～6 にそれぞれ示した。

その結果、標準偏差の期待値（σ＾）の大きさは、JSCC-SOP 法で 4.27U/L、KN で 2.05 U/L、WK で 2.09 U/L、ARVL で 1.69 U/L、ARVN で 0.93 U/L、RD で 3.44 U/L であった。



(活性単位;U/l,37℃)

平均値x	71.80
S.D.x	86.35
平均値y	71.85
S.D.y	88.58
検体数	50
相関係数	0.99789
回帰式	y=-1.647+1.024x
Sy・x	5.81
差のSD	6.10
差の平均値	0.05
σ-1	4.17

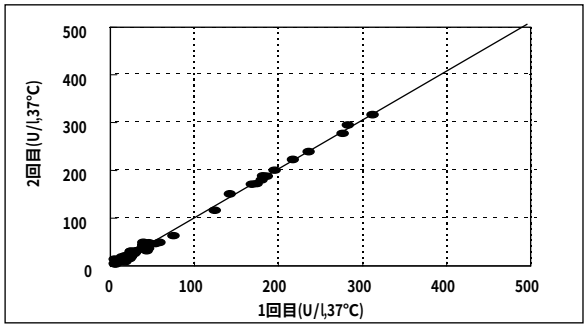
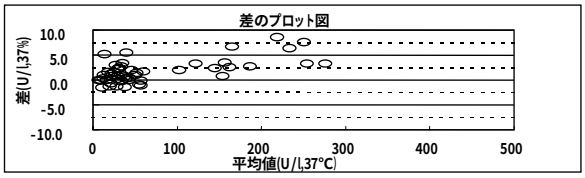


図1 精密さ評価のプロット(SOP)



(活性単位;U/l,37℃)

平均値x	70.86
S.D.x	74.15
平均値y	72.61
S.D.y	75.65
検体数	50
相関係数	0.99972
回帰式	y=0.340+1.020x
Sy・x	1.82
差のSD	2.33
差の平均値	1.75
σ-1	2.05

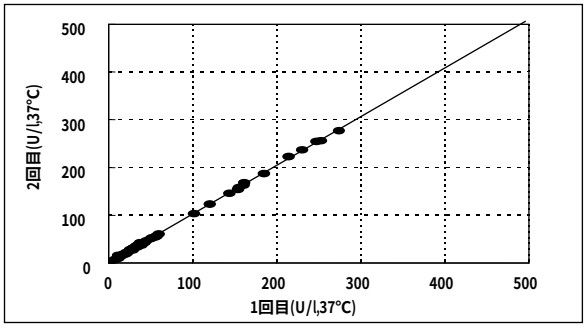
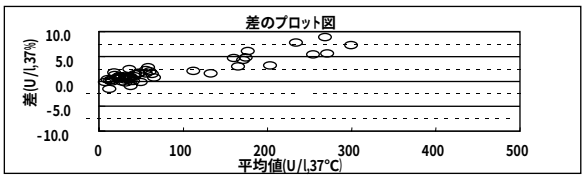


図2 精密さ評価のプロット(KN)



(活性単位;U/l,37℃)

平均値x	76.97
S.D.x	79.49
平均値y	78.89
S.D.y	81.56
検体数	50
相関係数	0.99993
回帰式	y=-0.077+1.026x
Sy・x	0.97
差のSD	2.27
差の平均値	1.92
σ'	2.09

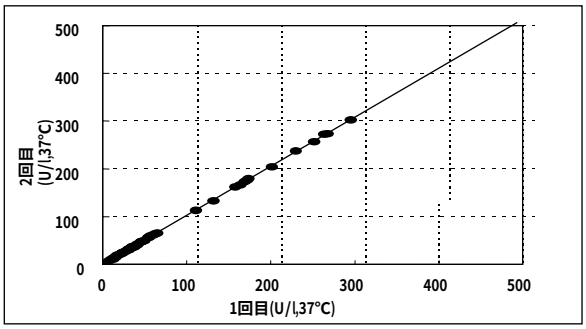
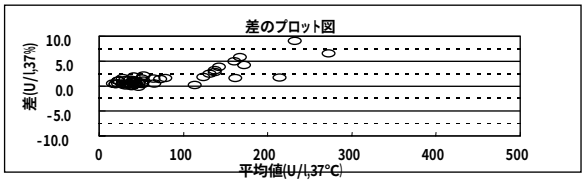


図3　精密さ評価のプロット図 (WK)



(活性単位;U/l,37℃)

平均値x	72.03
S.D.x	61.19
平均値y	73.58
S.D.y	62.71
検体数	50
相関係数	0.99986
回帰式	y=-0.221+1.025x
Sy・x	1.05
差のSD	1.83
差の平均値	1.55
σ'	1.69

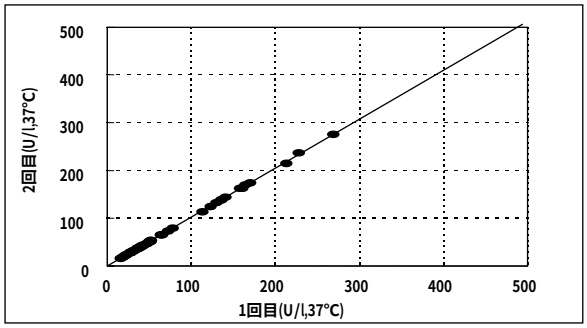
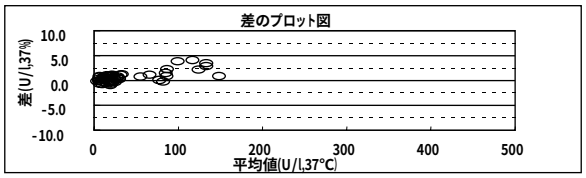


図4　精密さ評価のプロット図 (AR VL)



(活性単位;U/l,37℃)

平均値x	38.18
S.D.x	39.32
平均値y	38.91
S.D.y	40.09
検体数	50
相関係数	0.99980
回帰式	y=-0.003+1.019x
Sy・x	0.81
差のSD	1.10
差の平均値	0.73
g.r	0.03

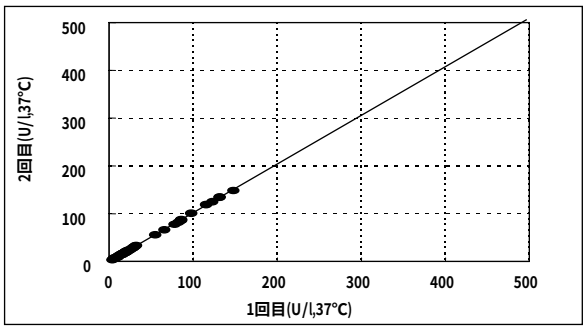
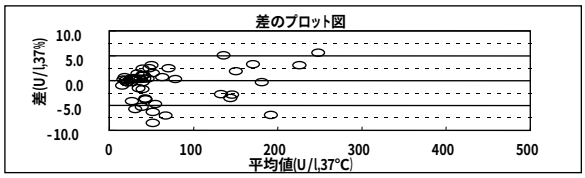


図5 精密さ評価のプロット(AR VN)



(活性単位;U/l,37℃)

平均値x	76.25
S.D.x	69.03
平均値y	74.71
S.D.y	67.82
検体数	50
相関係数	0.99783
回帰式	y=-0.037+0.980x
Sy・x	4.51
差のSD	4.66
差の平均値	-1.54
g.r	3.44

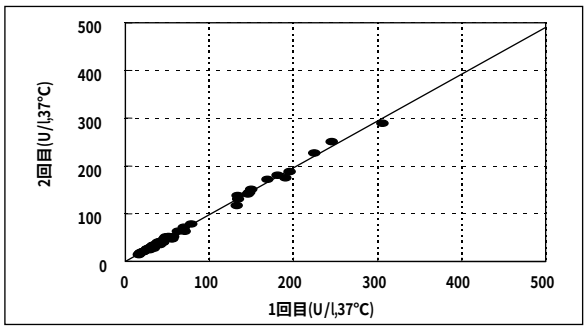


図6 精密さ評価のプロット(RD)

4-4-2 改良 JSCC 自動化法(案)との相関および反応性評価

JSCC 自動化法(案)と各社の試薬キットを用いて、多数の患者検体による反応性評価を行った結果を、表 1、図 7～11 にそれぞれ示した。

その結果、相関係数（ｒ）の大きさは　いずれも 0.99 以上であった。回帰式の y 切片(a)の大きさの範囲は-3.55～10.24、傾き(b)の大きさの範囲は 0.51～1.01 であり、測定キットにより大きな乖離検体は認められなかった。

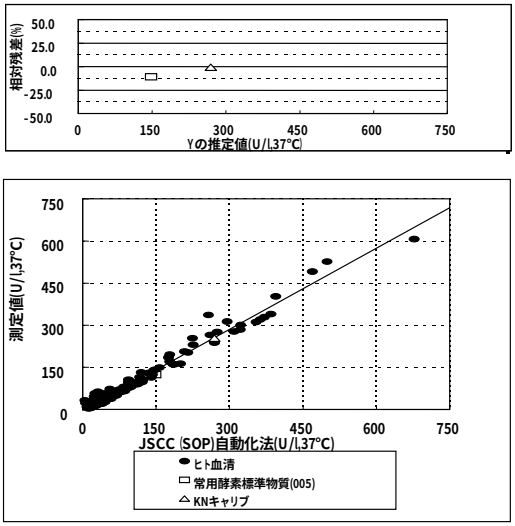
また、反応性評価試験での JC-ERM における相対残差の大きさの範囲は、-12.18%～0.99%で

あったが、個々の Y の 95%信頼区間での評価結果は、いずれの測定キットにおいても許容範囲を満たした結果が得られた。

表1 反応性評価のまとめ
試料：常用酵素標準物質(005)

	キット名	実測値		回帰式 y=a+bx				推定値	残差	相対残差		95 %信頼区間			総合	精密さ	
		X	Y	n	r	a	b			%	評価	下限値	上限値	評価	評価	Sy･x	σ^
	IFCC(SOP)自動化法	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	5.81	4.27
1	KN	147.9	123.8	197	0.9915	-3.550	0.963	138.9	-15.08	-10.86	×	110.39	167.36	○	×	1.82	2.05
2	WK	147.9	134.6	197	0.9922	-3.680	1.010	145.7	-11.07	-7.60	△	117.05	174.29	○	×	0.97	2.09
3	AR VL	147.9	116.4	197	0.9955	10.240	0.827	132.5	-16.14	-12.18	×	114.89	150.19	○	×	1.05	1.69
4	AR VN	147.9	66.6	197	0.9920	-0.085	0.512	75.6	-8.97	-11.87	×	60.89	90.25	○	×	0.81	0.93
5	RD	147.9	140.2	197	0.9937	6.274	0.896	138.8	1.37	0.99	○	116.15	161.51	○	○	4.51	3.44

相対残差：○:±5%以内,△:±10%以内,×:±11%以上
評価：○:±5%以内,×:±6%以上



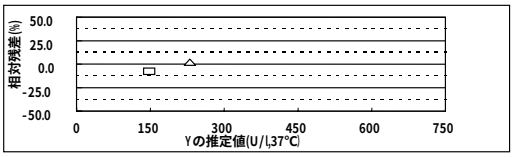
[反応性評価]

試料名	相対残差 (%)
常用酵素標準物質(005)	-10.86
KNキャリブ	-0.74

[直線回帰式] (活性単位：U/l,37℃)

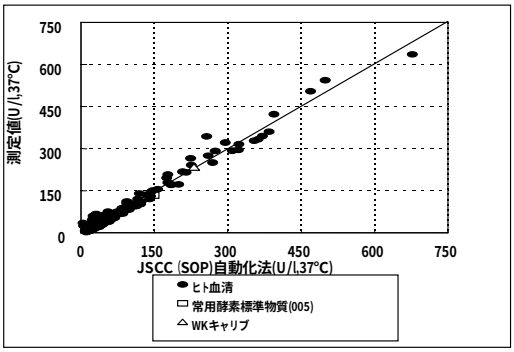
平均値x	86.20
S.D.x	113.53
平均値y	79.46
S.D.y	110.27
検体数	197
相関係数	0.9915
回帰式	y=-3.550+0.963x
Sy･x	14.413

図7 反応性評価のプロット (KN)



［反応性評価］

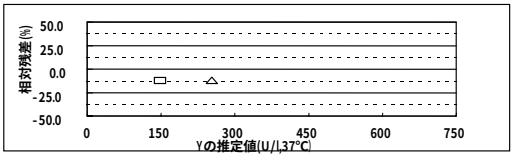
試料名	相対残差(%)
常用酵素標準物質(005)	-7.60
WKキャリブ	2.10



［直線回帰式］ (活性単位；U/l,37°C)

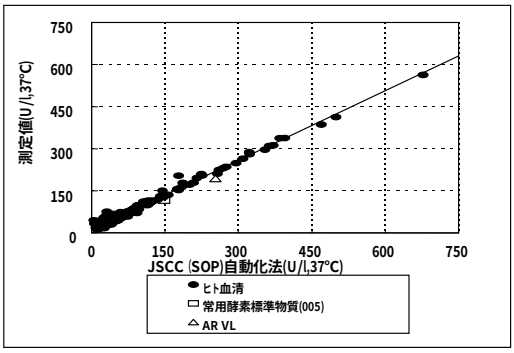
平均値x	86.20
S.D.x	113.53
平均値y	83.37
S.D.y	115.55
母体数	197
相関係数	0.9922
回帰式	y=-3.680+1.010x
Sy・x	14.479

図8 反応性評価のプロット (WK)



［反応性評価］

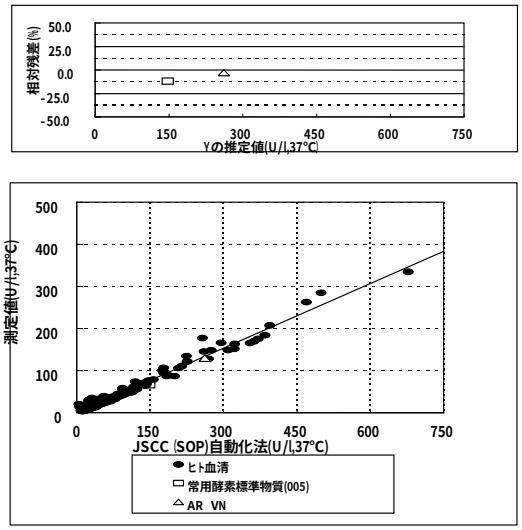
試料名	相対残差(%)
常用酵素標準物質(005)	-12.18
AR VL	-11.86



［直線回帰式］ (活性単位；U/l,37°C)

平均値x	86.20
S.D.x	113.53
平均値y	81.52
S.D.y	94.30
母体数	197
相関係数	0.9955
回帰式	y=10.240+0.827x
Sy・x	8.930

図9 反応性評価のプロット図 (ARVL)



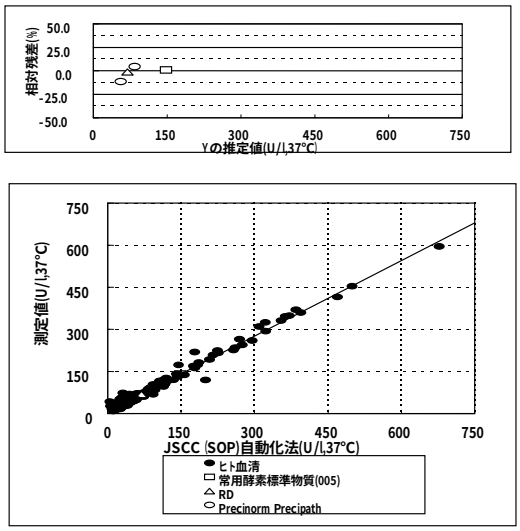
[反応性評価]

試料名	相対残差(%)
常用酵素標準物質(005)	-11.87
AR VN	-3.02

[直線回帰式] (活性単位;U/l,37°C)

平均値x	86.20
S.D.x	113.53
平均値y	44.01
S.D.y	58.54
検体数	197
相関係数	0.9920
回帰式	y=-0.085+0.512x
Sy・x	7.428

図10 反応性評価のプロット(AR VN)



[反応性評価]

試料名	相対残差(%)
常用酵素標準物質(005)	0.99
RD	-1.33
Precinorm	-11.48
Precipath	4.46

[直線回帰式] (活性単位;U/l,37°C)

平均値x	86.20
S.D.x	113.53
平均値y	83.53
S.D.y	102.39
検体数	197
相関係数	0.9937
回帰式	y=6.274+0.896x
Sy・x	11.474

図11 反応性評価のプロット(RD)

4-5 考察

改良 JSCC 常用基準法(案)と市販の日常検査用試薬キットを用いて、酵素標準物質(JC-ERM:Lot 005)の反応性試験を行った結果、以下の事項が確認できた。

まず、多数の患者検体を用いて、JSCC 常用基準法(案)と市販の日常検査用試薬キットによるリパーゼ活性値を比較した結果、いずれの測定キットによっても大きな乖離検体が認められなかった。

また、JC-ERM、各社の検量用物質の反応性試験を行った結果、相対残差の大きさの範囲は、

いずれの試薬キットにおいても±13%以内であった。また個々の Y の 95 %信頼区間での評価結果でも、いずれの測定キットにおいても許容範囲を満たした結果が得られた。

5.普遍性試験

5-1 目的：

改良 JSCC 常用基準法（案）試薬を用いて、標準物質の候補品（JC-ERM)、ヒトプール血清を各施設で測定し、標準物質の標準値を設定するときの普遍性を確認すること。

5-2 普遍性試験の概要：

今回、普遍性試験に使用した実験スケジュール、用手法および自動化法による普遍性実験実施要綱は、資料 7.8.9 のとおりである。

資料 7　普遍性試験スケジュール

月　日	内　　容
平成 20 年 1/10（木）	(1) 実験実施要綱の発送 (2) 調製済み試薬の発送 ＊測定まで冷蔵保存 (4) 実測Ｋファクター測定用試薬の発送 ＊測定まで冷蔵保存 (5) 試料の発送：ヒト自製プール血清(５本)、 JC-ERM（1 本） ＊測定まで凍結（-80 ℃）保存
1/11（金） ～ 1/18（金）	(1) 試薬の調製（調整後 1 週間以内に測定すること、 調製後の保存は冷蔵すること） (2) 試料の測定（用手法、自動化法）
1/19（土） ～ 1/25（金）	(1) 結果の報告
2 月中旬	(1) プロジェクト委員会開催（予定）

資料 8　リパーゼ活性の常用基準法（案）での普遍性実験実施要綱（自動化法）

1.配布資料の確認

以下の資料が配送されているかをご確認してください。

1）実施要綱（この用紙を含む）、2）LIP 報告用紙、3）実験スケジュール

2.試料、測定試薬、指示物質の確認

以下の試料、測定試薬が配送されているかを確認してください。

（1）試　料：ヒト自製プール血清（４濃度）４本、JC-ERM（1 本）：用手法と共有して使用してください。

（2）測定試薬：調整済みの試薬（一部、用時調製）

（3）実測Ｋファクター算出用試薬：反応試薬、指示物質

3．実施手順

1）試薬の調製

（1）測定試薬は、調整済み試薬をご使用下さい。

（2）防腐剤などは含まれておりませんので、到着後なるべく速やかに（1 週間以内）使用してください。

2）測定条件

（1）自動化法による測定条件は、自動分析装置ごとに測定ダイアグラムを設定してください。

（2）自動分析装置ごとに、予め実測Ｋファクターを算出してください。

3）試料の溶解

（1）ヒト自製プール血清（5 濃度）を室温で融解または放置後、充分に転倒混和してください。さらに遠心分離（3000 rpm、5 分間）をしてから、速やかに測定してください。試料の取扱いは、患者試料と同様に充分注意してください（感染性物質の有無の確認はしておりません）

（1）　ＪＣ-ＥＲＭは、指定の溶解方法に従って溶解してください。

4）測定方法

（1）自動分析法での測定は、ヒト自製プール血清（5 濃度）、JC-ERM（1 本）をそれぞれ 5 重測定して下さい。合わせてブランクを 5 重測定して下さい。

4.データの結果報告、問い合わせ先

（1）別添付の LIP 報告用紙に記入してください。

記入方法が不明の場合には、飯塚（筑波大）までお問い合わせください。

（2）測定結果は、12/28（金）までに、以下のあて先まで、メール、もしくは FAX にてご報告ください。

資料 9 リパーゼ活性の常用基準法（案）での普遍性実験実施要綱（用手法）

1.配布資料の確認

以下の資料が配送されているかをご確認してください。

1）実施要綱（この用紙を含む）、2）LIP 報告用紙、3）実験スケジュール、4）試薬調整法

2.試料、測定試薬の確認

以下の試料、測定試薬が配送されているかを確認してください。

（1）試　料：ヒト自製プール血清（４濃度）４本、ＪＣ-ＥRM（1 本）

（2）測定試薬：調整済みの試薬（一部、用時調製）

3.実施手順

1）試薬の調製

測定試薬は、送付時に同封された「LIP 活性測定試薬調製方法」に従って調製後ご使用下さい。

2）測定条件

用手法による測定条件は、送付時に同封された「測定操作法および試薬組成」をご参照下さい。

3）試料の溶解

（1）ヒト自製プール血清（5 濃度）は室温で融解または放置後、充分に転倒混和してください。さらに遠心分離（3000 rpm、5 分間）をしてから、速やかに測定してください。取扱いは、患者試料と同様に充分注意してください（感染性物質の有無の確認はしておりません）。

（2）ＪＣ-ＥRMは、指定の溶解方法に従って溶解してください。

4）測定方法

用手法の測定は、検定された分光光度計を使用し、ヒト自製プール血清（5 濃度）と JC-ERM の計 6 種類をそれぞれ 2 重測定して下さい。合わせてブランクを 2 重測定して下さい。

4.データの結果報告、問い合わせ先

（1）別添付の LIP 報告用紙に記入してください。

記入方法が不明の場合には、飯塚（筑波大）までお問い合わせください。

（2）測定結果は、12/28（金）までに、以下のあて先まで、メール、もしくは FAX にてご報告ください。

5-3 実施施設：

本実験に参加した施設は、(1)筑波大、(2)旭化成ファーマ（株）、(3)アルフレッサ　ファーマ（株）、(4)和光純薬（株）、(5)カイノス（株）の 5 施設とした。

5-4 測定試薬：

改良 JSCC 常用基準法（案）試薬を、旭化成ファーマで一括して調製したものを、各施設に冷蔵状態で配布した。

5-5 測定試料：

ヒト自製プール血清（4 本）、JC-ERM（1 本）の計５本を、各施設に冷凍状態で配布した。

5-6 測定条件：

用手法は、改良 JSCC 常用基準法（案）の測定操作法に従って、各試料を２重測定した。自動化法は、用手法の測定操作法に準じて、自動分析装置ごとに測定ダイアグラムを設定して実施し、各試料を５重測定した。なお、検量は、実測Ｋファクターを算出して行った。

5-7 評価方法：

各施設の測定結果の平均値から、総平均値、SD、CV %をそれぞれ算出した。

5-8 測定結果

用手法、自動化法による JC-ERM の測定結果を表 2 に示した。その結果、用手法による４施設の総平均値は 138.7 U/L、CV は 2.06 %、自動化法による 5 施設の総平均値は 166.0 U/L、CV は 3.59 %であり、いずれの方法においても施設間では大きな変動は認められなかった。しかし、用手法、自動化法での方法間で約 7 U/L の差が認められた。

一方、ヒト自製プール血清による用手法では、検体と試薬の反応過程で白濁が生じ、反応が直線的に進行しないことが判明したので、用手法および自動化法とも実験を中止することにした。

表2 普遍性試験結果（まとめ）
試料（JC-ERM）

No.	施設名	用手法（n＝2）	自動化法（n＝5）
		平均値	平均値
1	旭化成	137.5	157.3
2	アルフレッサ	142.6	169.7
3	和光純薬	138.8	165.6
4	筑波大	135.9	164.2
5	カイノス	---	173.0
	平均値	138.70	165.96
	1SD	2.86	5.95
	CV %	2.06	3.59

5-9 考察

JC-ERM では、用手法、自動化法共に施設間の変動は小さかったが、方法間の差が認められた。一方、ヒト自製プール血清による用手法では、検体と試薬の反応過程で白濁が生じ、反応が直線的に進行しないことが判明した。JC-ERM で方法間に差が生じた原因も、この反応液の白濁によるものと考える。さらに、この白濁する現象は、JC-ERM よりヒトプール血清の方がより強いものであった。

また、自動化法による 2 波長（主波長から副波長を差し引く方法）測光では、この白濁の程度が補正されるが、分光光度計による単波長測定では補正できず、反応タイムコースがより曲がるものと考える。今後は、なぜ、このように反応液が白濁するのかを解明する必要がある。

6.実試料標準物質の作製プロトコル

6-1 トレーサビリティ連鎖

血清リパーゼ活性測定におけるトレーサビリティ連鎖を図 12 に示した。

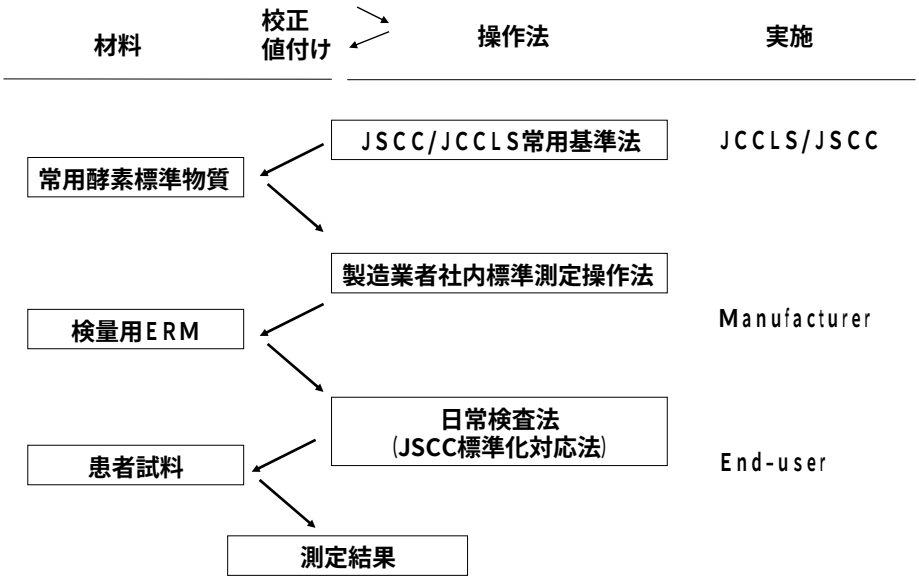


図12 リパーゼ活性測定のトレーサビイティ連鎖

6-2 試料の性状規格

血清リパーゼ活性における標準物質の性状は、血清ベースのものを充当することが妥当であると考える。しかし、より安定供給が可能なことなどを考慮すると、現在市販されている酵素標準物質（JC-ERM：Lot 005）などを標準物質候補品にすることが望ましい。

6-3 値付けの方法

6-1 に示したトレーサビリティ連鎖に従って、標準物質の値付けを行う。

7.今後の課題

第一反応に硫酸マグネシウムを添加した改良 JSCC 常用基準法（案）を用いて、反応性試験と普遍性試験を行った。その結果、JC-ERM とヒト血清との反応性は相対残差で最大 13%であった。しかし、改良した常用基準法（案）で標準値を付ける際の普遍性試験では、特にヒトプール血清で反応液がやや白濁し、反応タイムコースが曲がる現象が認められた。この原因を解明することが、今後の課題と考える。

8.結語

改良 JSCC 常用基準法（案）を用いて、反応性試験と普遍性試験を行った。その結果、JC-ERM とヒト血清との反応性は相対残差で最大 13%であった。しかし、ヒトプール血清で反応液がやや白濁する現象が認められ、この原因を解明することが、今後の課題と考える。

2-2-3-１５　尿中電解質成分

要旨

7）平成 18 年度の活動において作成した尿電解質成分の常用参照標準物質候補品の安定性試験を実施した。

8）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

9）本研究により尿電解質成分（Na、K、Cl）の常用参照標準物質としての有用性が確認された。

1．目的

本実試料項目群、J4（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の尿中生化学成分について、常用参照標準物質の作製を行うことが本研究の目的である。項目は平成 18 年度の研究により、Na、K、Cl とした。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／C1 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	山崎　浩樹	株式会社テクノメディカ
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　助教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	津谷　泰樹	株式会社エイアンドティー
技術担当者	大塚　一郎	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	渡邊　郁子	株式会社常光
技術担当者	斉藤　憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	山崎　浩樹	株式会社テクノメディカ
技術担当者	横田　敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	保田　健二	株式会社日立ハイテクノロジーズ
技術担当者	田中　晶子	東芝メディカルシステムズ株式会社
技術担当者	辻　泰彦	日本電子株式会社

3．委員会の開催

平成 19 年度は安定性試験の為、会合開催はせず、電子メールにより連絡・報告を行った。

４．標準物質の設定概要

４－１　実験計画書

常用参照標準物質候補品に関しては平成 18 年度における活動で設定（平成 18 年度報告書参照のこと）した為、本年度は最終試験として本品の安定性を日常検査法により評価した。

４－２　共同実験

共同実験は実施せず、本検討に参加した代表企業にて実施した。

４－２－１　測定試料

平成18年度に設定した候補品を標準物質製造会社に-80℃および20℃に保存しておいたものを測定に使用した。

４－２－２　測定方法

１）測定法

日常検査法により-80℃、-20℃の 7 ヶ月および 13 ヶ月の保存品を測定した。

２）測定項目

Na、K、Cl

３）測定回数は以下のとおりである。

-80℃保存品：2 バイアル・2 重測定、二日間測定

-20℃保存品：5 バイアル・2 重測定、二日間測定

４－２－３　測定結果

測定結果を表１および２に示した。-20℃保存品を-80℃保存品を対象に評価した結果、±3%以内の結果を得た。

表１　７ヶ月保存品データ

2007年9月25日のデータ

・%はCONT 1(-80℃保存)を100%として表示
・2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	51.3	11.3	42.9
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	54.3	11.0	44.6
	%	105.8%	97.3%	104.0%
2	Ave.	54.4	11.0	44.7
	%	106.0%	97.3%	104.2%
3	Ave.	54.9	11.2	44.0
	%	107.0%	99.1%	102.6%
4	Ave.	55.6	11.2	43.6
	%	108.4%	99.1%	101.6%
5	Ave.	53.9	11.0	43.7
	%	105.1%	97.3%	101.9%
CONT2	Ave.	53.7	11.3	43.3
	%	104.7%	100.0%	100.9%

標準液　第二濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	105.3	33.0	89.4
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	103.3	33.3	89.7
	%	98.1%	100.9%	100.3%
2	Ave.	105.0	33.5	88.9
	%	99.7%	101.5%	99.4%
3	Ave.	103.3	33.4	89.0
	%	98.1%	101.2%	99.6%
4	Ave.	103.0	33.2	89.1
	%	97.8%	100.6%	99.7%
5	Ave.	106.1	33.7	89.2
	%	100.8%	102.1%	99.8%
CONT2	Ave.	105.6	33.3	89.6
	%	100.3%	100.9%	100.2%

標準液　第三濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	183.2	66.2	162.8
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	189.3	67.6	164.1
	%	103.3%	102.1%	100.8%
2	Ave.	186.6	67.2	164.1
	%	101.9%	101.5%	100.8%
3	Ave.	186.1	66.3	164.2
	%	101.6%	100.2%	100.9%
4	Ave.	189.7	67.4	163.5
	%	103.5%	101.8%	100.4%
5	Ave.	188.3	67.3	164.4
	%	102.8%	101.7%	101.0%
CONT2	Ave.	186.6	67.1	165.2
	%	101.9%	101.4%	101.5%

2007年10月2日のデータ

・%はCONT 1(-80℃保存)を100%として表
・2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	54.0	10.9	44.7
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	54.1	10.9	45.3
	%	100.2%	100.0%	101.3%
2	Ave.	54.3	11.0	45.8
	%	100.6%	100.9%	102.5%
3	Ave.	55.0	11.0	45.6
	%	101.9%	100.9%	102.0%
4	Ave.	56.7	10.9	46.6
	%	105.0%	100.0%	104.3%
5	Ave.	55.2	10.9	46.4
	%	102.2%	100.0%	103.8%
CONT2	Ave.	55.9	10.9	47.2
	%	103.5%	100.0%	105.6%

標準液　第二濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	105.3	31.9	91.9
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	106.5	32.0	91.7
	%	101.1%	100.3%	99.8%
2	Ave.	106.7	32.2	91.8
	%	101.3%	100.9%	99.9%
3	Ave.	106.5	32.1	91.7
	%	101.1%	100.6%	99.8%
4	Ave.	107.2	32.2	91.6
	%	101.8%	100.9%	99.7%
5	Ave.	106.2	32.7	91.7
	%	100.9%	102.5%	99.8%
CONT2	Ave.	107.8	31.9	92.3
	%	102.4%	100.0%	100.4%

標準液　第三濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	181.8	63.5	160.2
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	182.9	65.3	163.5
	%	100.6%	102.8%	102.1%
2	Ave.	184.1	64.8	162.3
	%	101.3%	102.0%	101.3%
3	Ave.	183.9	64.4	162.7
	%	101.2%	101.4%	101.6%
4	Ave.	184.0	64.5	162.6
	%	101.2%	101.6%	101.5%
5	Ave.	184.3	64.5	162.0
	%	101.4%	101.6%	101.1%
CONT2	Ave.	184.3	64.7	162.0
	%	101.4%	101.9%	101.1%

表２　13ヶ月保存品データ

2008年2月29日のデータ

・%はCONT 1(-80℃保存)を100%として表示
・2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	51.9	10.5	43.3
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	54.2	10.7	44.4
	%	104.4%	101.9%	102.5%
2	Ave.	54.9	11.0	45.3
	%	105.8%	104.8%	104.6%
3	Ave.	53.1	10.8	44.9
	%	102.3%	102.9%	103.7%
4	Ave.	52.9	10.8	44.1
	%	101.9%	102.9%	101.8%
5	Ave.	51.7	10.7	44.0
	%	99.6%	101.9%	101.6%
CONT2	Ave.	52.9	10.8	44.6
	%	101.9%	102.9%	103.0%

標準液　第二濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	103.4	31.8	88.6
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	104.1	32.1	89.1
	%	100.7%	100.9%	100.6%
2	Ave.	105.2	32.3	90.0
	%	101.7%	101.6%	101.6%
3	Ave.	105.7	32.3	90.4
	%	102.2%	101.6%	102.0%
4	Ave.	106.4	32.3	90.9
	%	102.9%	101.6%	102.6%
5	Ave.	107.0	32.4	91.3
	%	103.5%	101.9%	103.0%
CONT2	Ave.	107.1	32.4	91.4
	%	103.6%	101.9%	103.2%

標準液　第三濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	180.7	63.9	159.3
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	180.5	63.8	159.4
	%	99.9%	99.8%	100.1%
2	Ave.	182.0	64.1	158.9
	%	100.7%	100.3%	99.7%
3	Ave.	181.7	64.0	159.0
	%	100.6%	100.2%	99.8%
4	Ave.	180.9	63.5	157.6
	%	100.1%	99.4%	98.9%
5	Ave.	180.8	64.5	158.2
	%	100.1%	100.9%	99.3%
CONT2	Ave.	181.2	64.2	158.2
	%	100.3%	100.5%	99.3%

2008年3月4日のデータ

・%はCONT 1(-80℃保存)を100%として表
・2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	54.3	10.7	44.1
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	53.9	11.0	44.2
	%	99.3%	102.8%	100.2%
2	Ave.	54.1	10.9	44.7
	%	99.6%	101.9%	101.4%
3	Ave.	53.5	10.8	44.1
	%	98.5%	100.9%	100.0%
4	Ave.	53.2	10.8	44.7
	%	98.0%	100.9%	101.4%
5	Ave.	53.8	11.0	44.3
	%	99.1%	102.8%	100.5%
CONT2	Ave.	54.2	10.9	44.9
	%	99.8%	101.9%	101.8%

標準液　第二濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	103.3	31.9	88.5
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	104.3	31.9	89.5
	%	101.0%	100.0%	101.1%
2	Ave.	104.9	32.1	88.8
	%	101.5%	100.6%	100.3%
3	Ave.	105.0	32.2	89.3
	%	101.6%	100.9%	100.9%
4	Ave.	106.9	32.5	90.2
	%	103.5%	101.9%	101.9%
5	Ave.	107.7	32.6	90.8
	%	104.3%	102.2%	102.6%
CONT2	Ave.	107.5	32.6	90.6
	%	104.1%	102.2%	102.4%

標準液　第三濃度

Std		Na	K	Cl
CONT1	Ave.	181.1	63.7	157.2
	%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	181.5	64.2	158.1
	%	100.2%	100.8%	100.6%
2	Ave.	182.7	64.3	158.2
	%	100.9%	100.9%	100.6%
3	Ave.	182.1	64.5	158.0
	%	100.6%	101.3%	100.5%
4	Ave.	181.3	64.3	157.3
	%	100.1%	100.9%	100.1%
5	Ave.	181.7	64.8	157.6
	%	100.3%	101.7%	100.3%
CONT2	Ave.	181.3	64.0	156.6
	%	100.1%	100.5%	99.6%

5．実試料標準物質の作製プロトコル

5-1　トレーサビリティ連鎖

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

5-2　試料の性状規格および値付けの方法

各項目の設定濃度・性状規格・値付けの方法等は平成 18 年度の報告書を参照。

6．今後の課題

尿素窒素に関しては 13 ヶ月の安定性評価を実施し、他の項目同様一年間の安定性の確保を実施する。

7．結び

平成 19 年度の研究において、尿中電解質（Na、K、Cl）の常用参照標準物質候補品の安定性試験が終了し本研究の目的を達成した。平成 20 年度には本品の製造を ISO17025／ISO Guide 34 の認定取得機関に委託し供給が開始される予定である。

2-2-3-16　尿中生化学成分

要旨

1）平成 18 年度の活動において作成した尿中生化学成分の常用参照標準物質候補品（アミラーゼを除く）の安定性試験を実施した。

2）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

3）本研究により尿用のカルシウム・マグネシウム・尿酸・尿素窒素・グルコース・クレアチニン、無機リンの常用参照標準物質としての有用性が確認された。

1．目的

本実試料項目群、J4（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の尿中生化学成分について、常用参照標準物質の作製を行うことが本研究の目的である。項目は平成 18 年度の研究により、カルシウム・マグネシウム・尿酸・尿素窒素・グルコース・クレアチニン、無機リンとした。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／J4 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	五来　隆	株式会社カイノス
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　准教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	山下　章吾	アークレイマーケティング株式会社
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	大塚　一郎	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	谷口　嘉之	オリエンタル酵母工業株式会社
技術担当者	五来　隆	株式会社カイノス
技術担当者	大和　隆	協和メデックス株式会社
技術担当者	吉田　敏之	シスメックス株式会社
技術担当者	田中　龍彦	株式会社シノテスト
技術担当者	根占　哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤　憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	蒲澤　匠	デンカ生研株式会社
技術担当者	須釜　祐司	日東紡績株式会社

	氏名	所属
技術担当者	杉原　充	富士フイルム株式会社
技術担当者	横田　敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	竹森　圭二	株式会社ミズホメディー
技術担当者	秋元　一隆	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	花田　寿郎	和光純薬工業株式会社
技術担当者	細井　健二	第一化学薬品株式会社
技術担当者	新井　健史	関東化学株式会社
技術担当者	水口　克彦	東洋紡績株式会社
技術担当者	久米　俊久	極東製薬工業株式会社

３．委員会の開催

平成 19 年度は安定性試験の為、会合開催はせず、電子メールにより連絡・報告を行った。

４．標準物質の設定概要

４－１　実験計画書

常用参照標準物質候補品に関しては平成 18 年度における活動で設定（平成 18 年度報告書参照のこと）した為、本年度は最終試験として本品の安定性を日常検査法により評価した。

４-２　共同実験

共同実験は実施せず、本検討に参加した代表企業にて実施した。

４-２-１　測定試料

平成18年度に設定した候補品を標準物質製造会社に-80℃および20℃に保存しておいたものを測定に使用した。

４-２-２　測定方法

４）測定法

日常検査法により-80℃、-20℃の 7 ヶ月および 13 ヶ月（マグネシウムは処方変更を実施した為、3 ヶ月および 9 ヶ月）の保存品を測定した。

５）測定項目

カルシウム・マグネシウム・尿酸・尿素窒素・グルコース・クレアチニン・無機リン

６）測定回数は以下のとおりである。

-80℃保存品：2 バイアル・2 重測定（マグネシウムは三重測定)、二日間測定

-20℃保存品：5 バイアル・2 重測定（マグネシウムは三重測定)、二日間測定

４-２-３　測定結果

測定結果を表１～４にそれぞれ示した。-20℃保存品を-80℃保存品を対象に評価した結果、±3%以内となった。

表１　７ヶ月保存品データ①

2007年8月17日のデータ

・%はCONT 1(-80℃保存) を100%として表示
・Mgは3重測定の平均値、他は2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	Mg
CONT1	Ave.	5.02	49.75	49.26	4.83	98.81	10.21	5.36	5.08
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	4.97	49.67	49.48	4.82	99.52	10.21	5.34	4.93
	%	99.1%	99.8%	100.4%	99.9%	100.7%	100.0%	99.6%	97.0%
2	Ave.	4.97	49.43	49.48	4.79	99.89	10.19	5.33	4.98
	%	99.1%	99.4%	100.4%	99.3%	101.1%	99.8%	99.5%	98.0%
3	Ave.	5.05	49.67	49.48	4.84	99.85	10.28	5.41	5.02
	%	100.6%	99.8%	100.4%	100.2%	101.1%	100.6%	101.0%	98.8%
4	Ave.	4.99	48.97	48.59	4.83	100.15	10.22	5.44	4.97
	%	99.4%	98.4%	98.6%	100.0%	101.4%	100.0%	101.5%	97.8%
5	Ave.	5.00	49.51	49.03	4.84	100.15	10.27	5.40	5.15
	%	99.7%	99.5%	99.5%	100.2%	101.4%	100.5%	100.7%	101.3%
CONT2	Ave.	4.99	49.20	48.81	4.81	99.82	10.25	5.42	5.24
	%	99.4%	98.9%	99.1%	99.7%	101.0%	100.3%	101.1%	103.1%

標準液　第二濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	Mg
CONT1	Ave.	9.75	98.40	97.39	10.20	200.36	52.17	10.93	9.95
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	9.75	98.40	98.73	10.32	201.51	51.29	10.77	9.84
	%	100.0%	100.0%	101.4%	101.2%	100.6%	98.3%	98.5%	98.9%
2	Ave.	9.71	99.10	98.06	10.15	198.46	51.31	10.88	9.87
	%	99.5%	100.7%	100.7%	99.5%	99.1%	98.4%	99.5%	99.2%
3	Ave.	9.63	98.32	97.61	10.21	198.40	51.27	10.92	9.64
	%	98.7%	99.9%	100.2%	100.1%	99.0%	98.3%	99.9%	96.9%
4	Ave.	9.67	98.63	98.06	10.40	200.10	51.48	10.80	9.62
	%	99.2%	100.2%	100.7%	102.0%	99.9%	98.7%	98.8%	96.7%
5	Ave.	9.66	99.09	98.74	10.34	201.25	51.48	10.80	9.64
	%	99.1%	100.7%	101.4%	101.4%	100.4%	98.7%	98.8%	96.9%
CONT2	Ave.	9.71	99.10	98.29	10.19	200.48	51.80	10.93	9.64
	%	99.5%	100.7%	100.9%	99.9%	100.1%	99.3%	100.0%	96.9%

標準液　第三濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	Mg
CONT1	Ave.	15.99	128.32	126.72	15.68	499.61	103.13	21.90	11.61
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	16.11	129.33	126.94	15.65	498.50	102.37	21.57	11.56
	%	100.8%	100.8%	100.2%	99.8%	99.8%	99.3%	98.5%	99.6%
2	Ave.	16.07	127.27	125.58	15.78	495.92	102.37	21.48	11.64
	%	100.5%	99.2%	99.1%	100.6%	99.3%	99.3%	98.1%	100.3%
3	Ave.	16.08	128.47	129.18	15.62	499.54	103.63	21.85	11.58
	%	100.6%	100.1%	101.9%	99.6%	100.0%	100.5%	99.8%	99.7%
4	Ave.	15.99	127.00	126.94	15.49	497.11	103.77	22.08	11.49
	%	100.0%	99.0%	100.2%	98.8%	99.5%	100.6%	100.8%	99.0%
5	Ave.	16.11	128.01	127.61	15.72	502.92	103.59	22.28	11.61
	%	100.8%	99.8%	100.7%	100.3%	100.7%	100.4%	101.7%	100.0%
CONT2	Ave.	16.00	127.31	127.16	15.38	499.95	103.54	21.81	11.54
	%	100.1%	99.2%	100.3%	98.1%	100.1%	100.4%	99.6%	99.4%

表２　７ヶ月保存品データ②

2007年8月17日のデータ

・%はCONT 1（-80℃保存）を100%として表示
・Mgは3重測定の平均値、他は2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	Mg
CONT1	Ave.	4.98	49.22	49.61	4.95	99.59	10.04	5.34	5.33
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	4.91	49.68	49.39	5.02	99.79	10.12	5.28	5.22
	%	98.7%	100.9%	99.6%	101.3%	100.2%	100.8%	99.0%	97.9%
2	Ave.	4.93	49.45	50.06	5.03	99.48	10.06	5.31	5.37
	%	99.1%	100.5%	100.9%	101.6%	99.9%	100.2%	99.5%	100.8%
3	Ave.	4.94	48.99	49.16	5.04	99.89	10.09	5.30	5.26
	%	99.3%	99.5%	99.1%	101.7%	100.3%	100.4%	99.3%	98.7%
4	Ave.	4.93	49.29	49.36	5.00	99.33	10.06	5.31	5.26
	%	99.1%	100.1%	99.5%	100.9%	99.7%	100.2%	99.4%	98.7%
5	Ave.	4.93	49.45	49.84	5.01	99.59	10.13	5.27	5.20
	%	99.1%	100.5%	100.5%	101.1%	100.0%	100.8%	98.8%	97.6%
CONT2	Ave.	4.93	49.29	49.61	4.95	98.87	10.08	5.30	5.21
	%	99.1%	100.1%	100.0%	100.0%	99.3%	100.4%	99.3%	97.7%

標準液　第二濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	Mg
CONT1	Ave.	9.60	97.80	99.54	10.42	198.92	50.86	10.85	10.22
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	9.54	97.34	98.64	10.49	197.04	51.27	10.87	10.07
	%	99.4%	99.5%	99.1%	100.7%	99.1%	100.8%	100.2%	98.5%
2	Ave.	9.54	98.41	98.19	10.42	199.05	51.15	10.87	10.22
	%	99.4%	100.6%	98.6%	100.0%	100.1%	100.6%	100.2%	100.0%
3	Ave.	9.55	98.10	99.09	10.50	199.25	51.08	10.82	10.21
	%	99.5%	100.3%	99.5%	100.7%	100.2%	100.4%	99.7%	99.9%
4	Ave.	9.52	98.48	97.97	10.53	198.72	51.24	10.86	10.21
	%	99.2%	100.7%	98.4%	101.1%	99.9%	100.7%	100.1%	99.9%
5	Ave.	9.52	97.59	98.87	10.47	199.10	51.01	10.93	10.22
	%	99.2%	99.8%	99.3%	100.5%	100.1%	100.3%	100.7%	100.0%
CONT2	Ave.	9.58	98.25	98.54	10.58	198.27	51.01	10.87	10.13
	%	99.8%	100.5%	99.0%	101.5%	99.7%	100.3%	100.2%	99.1%

標準液　第三濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	Mg
CONT1	Ave.	16.01	127.49	128.64	15.78	498.70	101.88	21.89	12.12
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	15.89	127.19	129.09	15.92	500.97	102.29	21.89	12.11
	%	99.3%	99.8%	100.3%	100.9%	100.5%	100.4%	100.0%	99.9%
2	Ave.	15.96	127.80	129.54	15.84	494.77	100.50	21.78	12.13
	%	99.7%	100.2%	100.7%	100.4%	99.2%	98.6%	99.5%	100.1%
3	Ave.	15.96	125.74	129.31	15.86	497.61	101.92	21.86	12.11
	%	99.7%	98.6%	100.5%	100.5%	99.8%	100.0%	99.9%	99.9%
4	Ave.	15.87	127.57	129.31	16.09	496.97	101.35	21.92	12.04
	%	99.1%	100.1%	100.5%	102.0%	99.7%	99.5%	100.1%	99.3%
5	Ave.	15.81	127.04	128.64	15.86	496.12	101.57	21.94	12.16
	%	98.8%	99.6%	100.0%	100.5%	99.5%	99.7%	100.2%	100.3%
CONT2	Ave.	15.93	127.72	128.87	15.84	497.86	102.74	21.85	12.14
	%	99.5%	100.2%	100.2%	100.3%	99.8%	100.8%	99.8%	100.1%

表３　13ヶ月保存品データ①

2008年2月9日のデータ

・%はCONT 1(-80℃保存) を100%として表示
・Mgは3重測定の平均値、他は2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	IP (血清)	Mg
CONT1	Ave.	4.83	50.28	49.02	4.90	98.95	10.24	5.08	3.94	5.11
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	4.89	50.28	49.02	4.96	99.86	10.36	5.06	3.95	5.12
	%	101.2%	100.0%	100.0%	101.2%	100.9%	101.2%	99.6%	100.3%	100.2%
2	Ave.	4.88	50.08	49.27	4.90	100.03	10.34	5.03	3.98	5.08
	%	101.0%	99.6%	100.5%	100.0%	101.1%	101.0%	99.0%	101.0%	99.4%
3	Ave.	4.90	50.59	48.78		99.03	10.37	5.07	3.97	5.07
	%	101.4%	100.6%	99.5%		100.1%	101.3%	99.8%	100.8%	99.2%
4	Ave.	4.89	50.18	48.78	4.97	98.88	10.22	5.09	3.95	5.11
	%	101.2%	99.8%	99.5%	101.4%	99.9%	99.8%	100.2%	100.3%	100.0%
5	Ave.	4.86	50.49	49.51	4.88	98.89	10.27	5.05	4.01	5.14
	%	100.6%	100.4%	101.0%	99.6%	99.9%	100.3%	99.4%	101.8%	100.6%
CONT2	Ave.	4.88	50.39	49.51	4.93	99.45	10.40	5.03	3.96	5.13
	%	101.0%	100.2%	101.0%	100.6%	100.5%	101.6%	99.0%	100.5%	100.4%

標準液　第二濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	IP (血清)	Mg
CONT1	Ave.	9.86	100.04	98.05	10.31	198.23	51.86	10.80	7.05	10.25
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	9.87	100.40	98.29	10.38	199.99	52.15	10.82	7.15	10.35
	%	100.1%	100.4%	100.2%	100.7%	100.9%	100.6%	100.2%	101.4%	101.0%
2	Ave.	9.93	100.14	98.29	10.32	199.18	52.17	10.77	7.18	10.27
	%	100.7%	100.1%	100.2%	100.1%	100.5%	100.6%	99.7%	101.8%	100.2%
3	Ave.	9.81	100.81	98.54	10.38	199.36	52.15	10.81	7.12	10.20
	%	99.5%	100.8%	100.5%	100.7%	100.6%	100.6%	100.1%	101.0%	99.5%
4	Ave.	9.89	100.55	98.54	10.40	197.60	51.77	10.70	7.11	10.18
	%	100.3%	100.5%	100.5%	100.9%	99.7%	99.8%	99.1%	100.9%	99.3%
5	Ave.	9.87	100.19	98.29	10.36	198.85	51.95	10.71	7.09	10.37
	%	100.1%	100.1%	100.2%	100.5%	100.3%	100.2%	99.2%	100.6%	101.2%
CONT2	Ave.	9.87	100.61	99.27	10.27	199.36	52.44	10.71	7.08	10.29
	%	100.1%	100.6%	101.2%	99.6%	100.6%	101.1%	99.2%	100.4%	100.4%

標準液　第三濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	IP (血清)	Mg
CONT1	Ave.	15.73	130.11	127.80	15.61	504.82	103.48	21.56	10.26	12.25
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	15.82	129.23	127.32	15.63	493.03	103.60	21.56	10.20	12.22
	%	100.6%	99.3%	99.6%	100.1%	97.7%	100.1%	100.0%	99.4%	99.8%
2	Ave.	15.90	129.07	128.05	15.64	502.37	102.93	21.79	10.28	12.21
	%	101.1%	99.2%	100.2%	100.2%	99.5%	99.5%	101.1%	100.2%	99.7%
3	Ave.	15.82	130.68	128.29	15.81	501.56	103.97	21.89	10.34	12.21
	%	100.6%	100.4%	100.4%	101.3%	99.4%	100.5%	101.5%	100.8%	99.7%
4	Ave.	15.79	130.52	128.78	15.70	499.88	103.70	21.61	10.25	12.23
	%	100.4%	100.3%	100.8%	100.6%	99.0%	100.2%	100.2%	99.9%	99.8%
5	Ave.	15.86	129.07	127.80	15.62	500.87	104.07	21.67	10.24	12.23
	%	100.8%	99.2%	100.0%	100.1%	99.2%	100.6%	100.5%	99.8%	99.8%
CONT2	Ave.	15.83	130.06	128.54	15.62	506.76	103.97	21.63	10.26	12.22
	%	100.6%	100.0%	100.6%	100.1%	100.4%	100.5%	100.3%	100.0%	99.8%

2008年2月9日のデータ

・%はCONT 1（-80℃保存）を100%として表示
・Mgは3重測定の平均値、他は2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	IP（血清）	Mg
CONT1	Ave.	4.91	49.33	49.16	4.92	100.22	9.96	5.08	3.82	5.00
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	4.91	49.68	50.14	4.92	100.69	10.04	5.10	3.84	5.12
	%	100.0%	100.7%	102.0%	100.0%	100.5%	100.8%	100.4%	100.5%	102.4%
2	Ave.	4.93	49.58	49.40	4.95	100.36	10.00	5.19	3.82	5.07
	%	100.4%	100.5%	100.5%	100.6%	100.1%	100.4%	102.2%	100.0%	101.4%
3	Ave.	4.88	49.23	49.40	4.93	100.56	10.08	5.15	3.82	5.07
	%	99.4%	99.8%	100.5%	100.2%	100.3%	101.2%	101.4%	100.0%	101.4%
4	Ave.	4.87	49.68	49.65	4.95	99.88	10.09	5.19	3.83	5.10
	%	99.2%	100.7%	101.0%	100.6%	99.7%	101.3%	102.2%	100.3%	102.0%
5	Ave.	4.89	49.33	49.65	4.94	100.45	10.18	5.13	3.84	5.08
	%	99.6%	100.0%	101.0%	100.4%	100.2%	102.2%	101.0%	100.5%	101.6%
CONT2	Ave.	4.89	49.43	50.14	4.91	100.02	9.90	5.13	3.81	5.06
	%	99.6%	100.2%	102.0%	99.8%	99.8%	99.4%	101.0%	99.7%	101.2%

標準液　第二濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	IP（血清）	Mg
CONT1	Ave.	9.83	98.17	99.52	10.36	199.96	50.96	10.46	6.84	10.37
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	9.86	98.52	100.01	10.41	201.31	51.55	10.46	6.88	10.42
	%	100.3%	100.4%	100.5%	100.5%	100.7%	101.2%	100.0%	100.6%	100.5%
2	Ave.	9.96	98.68	100.26	10.41	201.24	51.24	10.44	6.85	10.48
	%	101.3%	100.5%	100.7%	100.5%	100.6%	100.5%	99.8%	100.1%	101.1%
3	Ave.	9.93	98.07	99.03	10.41	200.26	51.06	10.50	6.90	10.35
	%	101.0%	99.9%	99.5%	100.5%	100.2%	100.2%	100.4%	100.9%	99.8%
4	Ave.	9.96	98.02	98.54	10.41	201.19	51.35	10.51	6.89	10.40
	%	101.3%	99.8%	99.0%	100.5%	100.6%	100.8%	100.5%	100.7%	100.3%
5	Ave.	9.87	97.62	98.53	10.43	201.12	51.66	10.48	6.90	10.42
	%	100.4%	99.4%	99.0%	100.7%	100.6%	101.4%	100.2%	100.9%	100.5%
CONT2	Ave.	9.93	98.58	99.27	10.45	200.70	51.38	10.53	6.85	10.45
	%	101.0%	100.4%	99.7%	100.9%	100.4%	100.8%	100.7%	100.1%	100.8%

標準液　第三濃度

Std		UA	BUN	UN	Ca	GLU	CRE	IP(尿)	IP（血清）	Mg
CONT1	Ave.	15.79	126.80	127.28	15.84	499.42	102.45	21.04	9.98	12.37
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	15.92	127.05	128.02	15.74	500.57	102.20	21.12	9.95	12.39
	%	100.8%	100.2%	100.6%	99.4%	100.2%	99.8%	100.4%	99.7%	100.2%
2	Ave.	15.90	126.65	127.77	15.86	498.27	102.40	21.24	9.94	12.42
	%	100.7%	99.9%	100.4%	100.1%	99.8%	100.0%	101.0%	99.6%	100.4%
3	Ave.	15.93	127.20	128.02	15.83	500.70	102.71	21.27	9.95	12.50
	%	100.9%	100.3%	100.6%	99.9%	100.3%	100.3%	101.1%	99.7%	101.1%
4	Ave.	15.92	126.95	128.75	15.83	504.02	102.02	21.30	9.96	12.48
	%	100.8%	100.1%	101.2%	99.9%	100.9%	99.6%	101.2%	99.8%	100.9%
5	Ave.	15.92	126.90	128.02	15.87	499.74	101.86	20.99	9.91	12.46
	%	100.8%	100.1%	100.6%	100.2%	100.1%	99.4%	99.8%	99.3%	100.7%
CONT2	Ave.	15.84	127.00	128.51	15.86	495.01	101.47	21.22	9.91	12.44
	%	100.3%	100.2%	101.0%	100.1%	99.1%	99.0%	100.9%	99.3%	100.6%

5．実試料標準物質の作製プロトコル

5-1 トレーサビリティ連鎖

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

5-2 試料の性状規格および値付けの方法

各項目の設定濃度・性状規格・値付けの方法等を以下に示した。

	Ca	Mg
濃度-1	5 mg/dL	2 mg/dL
濃度-2	10 mg/dL	4 mg/dL
濃度-3	15 mg/dL	6 mg/dL
原料	$(CH_3COO)_2Ca \cdot H_2O$	$(CH_3COO)_2Mg \cdot 4H_2O$
備考	1. 100 mM NaCl 2. pH5.0 に調整 3. 0.2μm メンブランフィルター濾過	1. 100 mM NaCl 2. pH5.0 に調整 3. 0.2μm メンブランフィルター濾過
マトリックス	精製水	精製水
有効期間／保存	一年間／冷凍	9 ヶ月／冷凍
値付け	原子吸光光度法	原子吸光光度法

	UA	UN
濃度-1	5 mg/dL	50 mg/dL
濃度-2	10 mg/dL	90 mg/dL
濃度-3	16 mg/dL	120 mg/dL
原料	NIST SRM913a	NIST SRM912a
備考	1. 0.1N NaOH で尿酸 100 mg を溶解し、100 mL にメスアップ（液③-1）。 2. 液③-1 を設定濃度になるように 50 mM ホウ酸 pH8.0 + 1 mM EDTA で目標濃度になるように希釈。	1. 生理食塩水で設定濃度になるように調整。
マトリックス	ホウ酸緩衝液	精製水
有効期間／保存	一年間／冷凍	一年間／冷凍
値付け	JSCC 勧告法 （除蛋白・HPLC 法）	AACC 推奨法 （除蛋白・酵素法）

	Glu	Cre
濃度-1	100 mg/dL	10 mg/dL
濃度-2	200 mg/dL	50 mg/dL
濃度-3	500 mg/dL	100 mg/dL
原料	NIST SRM917b	NIST SRM914a
備考		
マトリックス		
有効期間／保存	一年間／冷凍	一年間／冷凍
値付け	JSCC 勧告法 （除蛋白・HPLC 法）	JSCC 勧告法 （除蛋白・HPLC 法）

	uIP
濃度-1	6 mg/dL
濃度-2	12 mg/dL
濃度-3	24 mg/dL
原料	NaH_2PO_4
備考	
マトリックス	精製水
有効期間／保存	一年間／冷凍
値付け	イオンクロマトグラフィー法

6．今後の課題

尿素窒素に関しては 13 ヶ月の安定性評価を実施し、他の項目同様一年間の安定性の確保を実施する。

7．結び

平成 19 年度の研究において、尿中生化学項目（Ca、Mg、UA、UN、CRE、Glu、IP）の常用参照標準物質候補品の安定性試験が終了し本研究の目的を達成した。平成 20 年度には本品の製造を ISO17025／ISO Guide 34 の認定取得機関に委託し供給が開始される予定である。

2-2-3-17　尿中アミラーゼ

要旨

1）平成 18 年度の活動において、P 型アイソザイムをヒト天然型に変更した処方にてプレ試験を実施し、収束性が見られたので、各メーカー使用のキャリブレータ、コントロールおよび検体も含めて各メーカー試薬と組み合わせた場合の測定値収束性の効果を調査した。測定値収束性の効果判定方法は各社の測定プロトコルに従い患者尿 25 例を測定した。その際、血清用常用参照物質（JCCLS CRM-001a）も検体として測定した。

2）その結果、プレ試験の結果が再現されず再検討が必要と考えられた。ただし、同一処方の試薬間、同一基質の試薬間においてかなりの乖離が見られたこと、プレ試験の検討において乖離が見られない試薬間においても問題があることから、検体の安定性、遠心分離を含む前処理も問題等標準物質では説明出来ない問題もあることが判明し今後の課題となった。

1．目的

本実試料項目群、J4（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の尿中アミラーゼについて、常用参照標準物質の作製を行うことが本研究の目的である。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／J4 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	五来　隆	株式会社カイノス
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　助教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	山下　章吾	アークレイマーケティング株式会社
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	大塚　一郎	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	谷口　嘉之	オリエンタル酵母工業株式会社
技術担当者	五来　隆	株式会社カイノス
技術担当者	大和　隆	協和メデックス株式会社
技術担当者	吉田　敏之	シスメックス株式会社
技術担当者	田中　龍彦	株式会社シノテスト
技術担当者	根占　哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤　憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	蒲澤　匠	デンカ生研株式会社
技術担当者	須釜　祐司	日東紡績株式会社
技術担当者	杉原　充	富士フイルム株式会社
技術担当者	横田　敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	竹森　圭二	株式会社ミズホメディー
技術担当者	秋元　一隆	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

	氏名	所属
技術担当者	花田　寿郎	和光純薬工業株式会社
技術担当者	細井　健二	第一化学薬品株式会社
技術担当者	新井　健史	関東化学株式会社
技術担当者	水口　克彦	東洋紡績株式会社
技術担当者	久米　俊久	極東製薬工業株式会社

3．委員会の開催

平成 19 年度は会議の開催はせず、電子メールにより連絡・報告を行った。

4．標準物質の設定概要

4－1　実験計画書

常用参照標準物質候補品に関しては平成 18 年度における活動で設定（平成 18 年度報告書参照のこと）した為、本年度は最終試験として本品の安定性を日常検査法により評価した。

4－2　共同実験

4－2－1　測定試料

1）市販キャリブレータ

2）日本常用酵素標準物質（JCCLS CRM-001a）

3）市販コントロール（Liuichek Level 1、Level 2）

4）HECTEF SRC 製造の実試料標準物質（3 濃度）プロトタイプ

5）旭化成ファーマ製造の尿アミラーゼ用常用参照標準物質候補品　三濃度

項目	濃度-1	濃度-2	濃度-3
尿中 Amylase	100 U/L	300 U/L	600 U/L

6）患者検体：25 例の患者尿

4－2－2　測定方法

日常検査法により上記試料の三重測定を各社にて測定した。

4－2－3　測定結果

日常検査法による各社測定値を常用参照標準物質候補品に対する係数にて補正した結果、各試料の収束性は図 1 のとおりであり、常用参照標準物質による収束性は、各社キャリブレータによる収束性を上回らなかった。

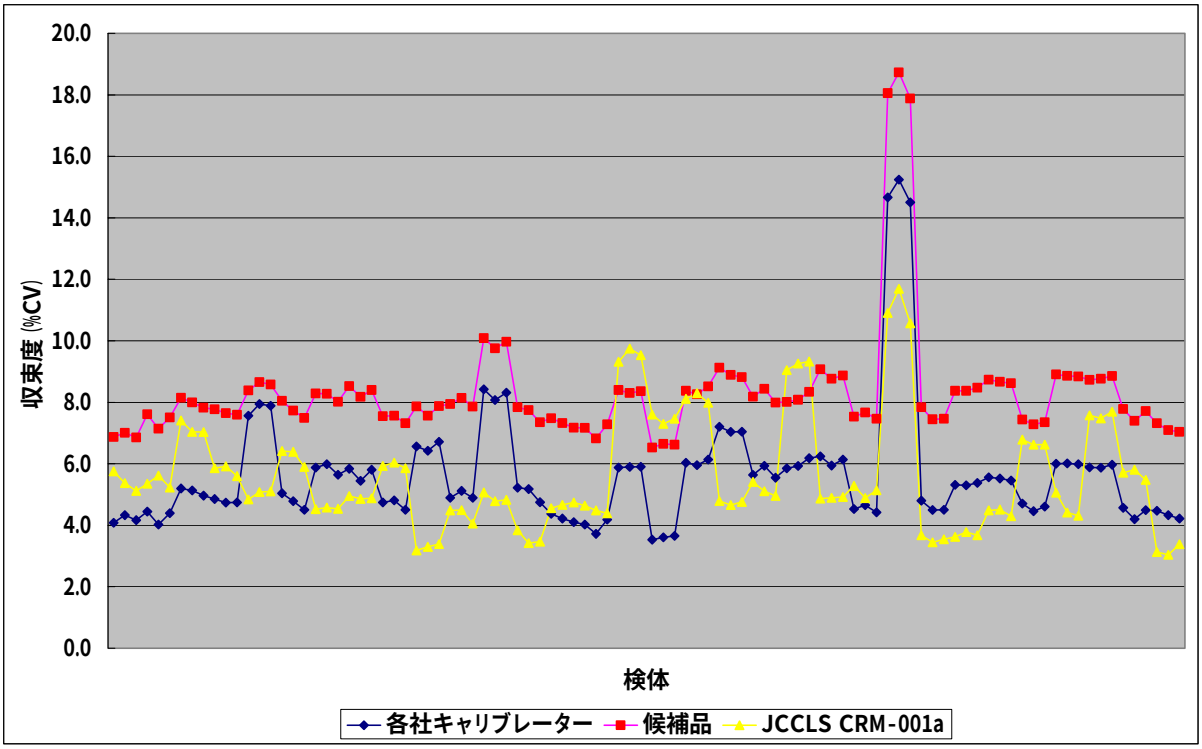

20.0
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
収束度 (%CV)
検体
各社キャリブレーター
候補品
JCCLS CRM-001a

図１　収束性の比較

５．実試料標準物質の作製プロトコル

５-１　トレーサビリティ連鎖

本候補品の尿アミラーゼの最上位に位置付ける。

５-２　試料の性状規格

今後設定する。

５-３　値付けの方法

今後設定する。

６．今後の課題

検体の安定性、遠心方法を含む前処理等の再検討が必要である。

７．結び

平成 19 年度の研究において、尿中アミラーゼの常用参照標準物質候補品の設定が可能と思われたが、残念ながら本研究の目的を達成することが出来なかった。その他の尿用常用参照標準物質が完成したので、尿アミラーゼに関しても早期な設定が必要と思われる。

2-2-3-18　血清無機リン

要旨

1）平成 18 年度の活動において作成した血清無機リンの常用参照標準物質候補品の安定性試験を実施した。

2）安定性試験において 13 ヶ月まで安定であることを確認し、常用参照標準物質として位置づけられることを確認した。

3）本研究により血清無機リンの常用参照標準物質としての有用性が確認された。

1．目的

本実試料項目群、J4（尿中電解質成分、尿中生化学成分、血清無機リン）内の血清無機リンについて、常用参照標準物質の作製を行うことが本研究の目的である。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	小林　隆	栄研化学株式会社
運営管理者（臨薬協）	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／J4 担当	中野　頼人	株式会社シノテスト
実行計画作成者	五来　隆	株式会社カイノス
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　助教授
技術アドバイザー	森下　芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	山下　章吾	アークレイマーケティング株式会社
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	大塚　一郎	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	谷口　嘉之	オリエンタル酵母工業株式会社
技術担当者	五来　隆	株式会社カイノス
技術担当者	大和　隆	協和メデックス株式会社
技術担当者	吉田　敏之	シスメックス株式会社
技術担当者	田中　龍彦	株式会社シノテスト
技術担当者	根占　哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤　憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	蒲澤　匠	デンカ生研株式会社
技術担当者	須釜　祐司	日東紡績株式会社
技術担当者	杉原　充	富士フイルム株式会社
技術担当者	横田　敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	竹森　圭二	株式会社ミズホメディー

	氏名	所属
技術担当者	秋元　一隆	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	花田　寿郎	和光純薬工業株式会社
技術担当者	細井　健二	第一化学薬品株式会社
技術担当者	新井　健史	関東化学株式会社
技術担当者	水口　克彦	東洋紡績株式会社
技術担当者	久米　俊久	極東製薬工業株式会社

3．委員会の開催

平成 19 年度は安定性試験の為、会合開催はせず、電子メールにより連絡・報告を行なった。

4．標準物質の設定概要

4－1　実験計画書

常用参照標準物質候補品に関しては平成 18 年度における活動で設定（平成 18 年度報告書参照のこと）した為、本年度は最終試験として本品の安定性を日常検査法により評価した。

4-2　共同実験

共同実験は実施せず、本検討に参加した代表企業にて実施した。

4-2-1　測定試料

平成18年度に設定した候補品を標準物質製造会社に-80℃および20℃に保存しておいたものを測定に使用した。

4-2-2　測定方法

7）測定法

日常検査法により-80℃、-20℃の 7 ヶ月および 13 ヶ月の保存品を測定した。

8）測定項目

血清無機リン

9）測定回数は以下のとおりである。

-80℃保存品：2 バイアル・2 重測定、二日間測定

-20℃保存品：5 バイアル・2 重測定、二日間測定

4-2-3　測定結果

測定結果を表１に示した。-20℃保存品を-80℃保存品を対象に評価した結果、±3%以内との結果を得た。

2007年8月17日及び2008年2月9日のデータ

・%はCONT 1（-80℃保存）を100%として表示
・Mgは3重測定の平均値、他は2重測定の平均値

標準液　第一濃度

Std		8/17-1	8/17-2	2/9-1	2/9-2
CONT1	Ave.	3.90	3.79	3.94	3.82
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	3.83	3.79	3.95	3.84
	%	98.2%	100.0%	100.3%	100.5%
2	Ave.	3.82	3.82	3.98	3.82
	%	98.1%	100.8%	101.0%	100.0%
3	Ave.	3.82	3.83	3.97	3.82
	%	97.9%	100.9%	100.8%	100.0%
4	Ave.	3.83	3.83	3.95	3.83
	%	98.2%	101.1%	100.3%	100.3%
5	Ave.	3.91	3.84	4.01	3.84
	%	100.4%	101.3%	101.8%	100.5%
CONT2	Ave.	3.87	3.83	3.96	3.81
	%	99.4%	101.1%	100.5%	99.7%

標準液　第二濃度

Std		IP（血清）	IP（血清）	IP（血清）	IP（血清）
CONT1	Ave.	6.87	6.99	7.05	6.84
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	6.82	7.01	7.15	6.88
	%	99.3%	100.3%	101.4%	100.6%
2	Ave.	6.82	6.97	7.18	6.85
	%	99.3%	99.7%	101.8%	100.1%
3	Ave.	6.83	6.96	7.12	6.90
	%	99.4%	99.6%	101.0%	100.9%
4	Ave.	6.84	6.93	7.11	6.89
	%	99.6%	99.1%	100.9%	100.7%
5	Ave.	6.83	6.90	7.09	6.90
	%	99.3%	98.7%	100.6%	100.9%
CONT2	Ave.	6.98	6.95	7.08	6.85
	%	101.6%	99.4%	100.4%	100.1%

標準液　第三濃度

Std		IP（血清）	IP（血清）	IP（血清）	IP（血清）
CONT1	Ave.	10.05	10.07	10.26	9.98
	%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
1	Ave.	9.96	10.22	10.20	9.95
	%	99.1%	101.5%	99.4%	99.7%
2	Ave.	10.12	10.17	10.28	9.94
	%	100.7%	101.0%	100.2%	99.6%
3	Ave.	9.92	10.24	10.34	9.95
	%	98.7%	101.7%	100.8%	99.7%
4	Ave.	10.03	10.19	10.25	9.96
	%	99.8%	101.2%	99.9%	99.8%
5	Ave.	10.07	10.10	10.24	9.91
	%	100.1%	100.2%	99.8%	99.3%
CONT2	Ave.	10.15	10.12	10.26	9.91
	%	101.0%	100.5%	100.0%	99.3%

5．実試料標準物質の作製プロトコル

5-1 トレーサビリティ連鎖

SI 単位系を最上位に位置づける体系とした。

5-2 試料の性状規格および値付けの方法

各項目の設定濃度・性状規格・値付けの方法等を以下に示した。

	IP
濃度-1	2 mg/dL
濃度-2	5 mg/dL
濃度-3	10 mg/dL
原料	NaH_2PO_4
備考	1. 事前に、イオンクロマトグラフィー法にて、人血清中の無機リン濃度を測定し、上記の試薬添加量から減量して、添加する。
マトリックス	ヒト血清（HECTEF 含窒素標準物質等の規格
有効期間／保存	一年間／冷凍
値付け	イオンクロマトグラフィー法

6．今後の課題

特に無し

7．結び

平成 19 年度の研究において、血清無機リン用常用参照標準物質候補品の安定性試験が終了し本研究の目的を達成した。平成 20 年度には本品の製造を ISO17025／ISO Guide 34 の認定取得機関に委託し供給が開始される予定である。

2-2-3-19　血清リチウム（　Li）

要旨
1）実試料標準物質候補品のプロトコルの作成を目的とする研究を実施した。
2）平成 18 年度までのまとめ：血清リチウムについては、国内各種サーベイランスの対象になっていないことから、具体的な互換性について認識がない。実試料標準物質候補品(3 水準)を用いて検証実験を行い、有用性を再確認した。
3）今年度は実試料標準物質候補品の安定性を確認した。
4）昨年度作成した実試料標準物質候補品を冷凍保存し、ＷＧ参加メーカーで測定した。測定方法は、電極法、色素法である。
5）冷凍保存で、１年間の安定性が確認できた。
6）実試料標準物質候補品の確立ができたと考えられた。

１．目的

本実試料項目群、J5（血清リチウム）において、「血清リチウムの実試料標準物質作成のための SOP 作成のための、作業・確認実験を行うことを目的とする。

２．委員会の構成

【WG 名　J5（項目：血清リチウム)】

	氏名	所属
技術アドバイザー	桑 克彦	筑波大学
技術アドバイザー	森下 芳孝	名古屋大学
柱 1／J５担当	中野 頼人	株式会社シノテスト
技術担当者	成瀬　美華	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	秋山　英時	株式会社常光
技術担当者	斎藤　憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	横田　敦子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	吉海　毅	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

３．委員会の開催

必要に応じ電子メールにて討議を実施した。

４．標準物質の設定概要

４－１実験計画書

（１）実試料標準物質候補品の作製・・・検査医学標準物質機構（ReCCS）に作成を依頼した。

- NIST の公的標準 SRM 924a を購入し、試料を調製、-70℃以下の凍結品として保存する。
- ベース：ヒト血清（プール）。
- 濃度およびポイント数：3 ポイント、約 0.8、約 1.1、約 1.8 mmol/L
- 個数：各濃度×約 100 本
- 容器および容量：容器 1.5 mL バイアル、容量 1.5 mL。
- 安定化剤：入れない。
- 安定性・保管方法：凍結品（-70 ℃以下）。開封後、半日。
- 値付け作業は　ReCCS が行う。
- 実試料標準物質候補品の値付けの方法は ReCCS に一任する。
- 可能であれば認証値および不確かさ（ISO GUM（註２））の算出も依頼する。
- トレーサビリティ連鎖図（案）は後述。

（２）分析

- 実試料標準物質候補品を-70℃および-20℃に保存する。
- 校正および測定は各社で定めた標準法に従い、実試料標準物質候補品を検体として測定する。

４－２共同実験

４－２－１測定試料

実試料標準物質候補品

ヒト血清ベースで NIST の公的標準 SRM 924a を ReCCS にて添加調製。

目的濃度 3 ポイント（約 0.8、約 1.1、約 1.8 mmol/L）凍結品（-70 ℃以下）。

ReCCS におけるフレーム光度法による値付けは 0.82、 1.12、 1.82 mmol/L であった。

４－２－２測定方法

校正および測定は各社で定めた標準法に従い、冷凍保存（-70℃、-20℃）していた実試料標準物質候補品を検体として測定する。

4-2-3測定結果

WG参加メーカー３社での測定結果を下表に示した。（データは添付資料参照）

方法は、色素法と電極法である。

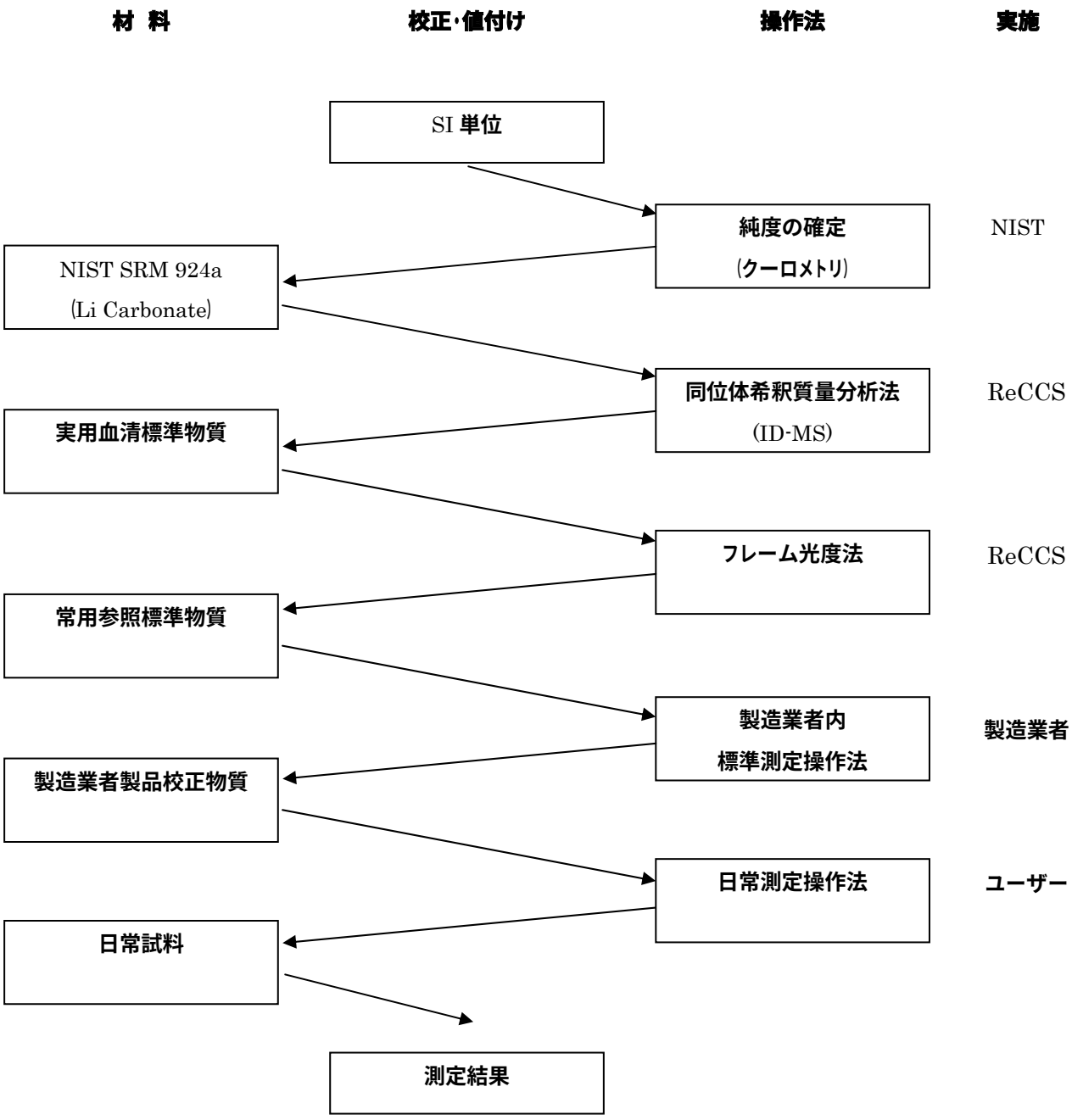
				０ヶ月	１ヶ月	３ヶ月	６ヶ月	９ヶ月	１２ヶ月
Ａ社	色素	－７０℃	レベル１	0.77	0.75	0.78		0.77	0.68
			レベル２	1.07	1.05	1.08		1.08	0.96
			レベル３	1.75	1.72	1.79		1.77	1.70
Ａ社	色素	－２０℃	レベル１	0.77	0.74	0.78	0.78	0.78	0.67
			レベル２	1.07	1.05	1.09	1.08	1.08	0.97
			レベル３	1.75	1.74	1.78	1.78	1.77	1.69
Ａ社	電極	－７０℃	レベル１	0.86	0.87	0.85			
			レベル２	1.16	1.17	1.14			
			レベル３	1.87	1.88	1.87			
Ａ社	電極	－２０℃	レベル１	0.86	0.86	0.84			
			レベル２	1.16	1.17	1.13			
			レベル３	1.87	1.89	1.85			
Ｂ社	電極	－７０℃	レベル１	0.84	0.84	0.87	0.89		
			レベル２	1.13	1.14	1.16	1.20		
			レベル３	1.84	1.82	1.81	1.84		
Ｃ社	色素	－７０℃	レベル１	0.84					0.80
			レベル２	1.12					1.10
			レベル３	1.87					1.80

５．実試料標準物質の作製プロトコル

５-１トレーサビリティ連鎖

基準分析法である同位体希釈質量分析法により値付けされたイオン電極用リチウム一次標準血清(Lot.L91-1)を校正用標準物質として、実用基準分析法であるフレーム光度法で測定する事によりトレーサビリティを確保した。

リチウム測定における構成の階層段階とトレーサビリティ連鎖



※NIST SRM 909b は血清ベースだが、電極法には使えない。他には NIST SRM 956b（血清ベース、凍結品）などがある。

５‐２試料の性状規格

今回 ReCCS にて調製の実試料標準物質候補品の仕様を以下に示す。

標準物質候補品の仕様

ベース：プール血清

濃度　1.0～2.0 mmol/L の範囲で 3 レベルとする。公的標準物資には NIST（SRM924a）を用いる。

おおよその濃度範囲は以下の通り。

レベル 1：約 0.8 mmol/L

レベル 2：約 1.1 mmol/L

レベル 3：約 1.8 mmol/L

密度　1.024 g/cm^3（25℃）とする。

粘性率　1.6mPa・s（20℃）とする。

水分量　0.928 kg/L（25℃）とする。

pH　7.6（37℃）とする。

電解質および共存イオン（Na^+、K^+、Cl^-、HCO_3^-）　いずれも基準範囲内のもの。

グルコース　基準範囲内のもの。

総タンパク、アルブミン、コレステロール、中性脂肪いずれも基準範囲内のもの。

アンモニア性窒素　0.15 mmol/dL とする。

アスコルビン酸　0.15 ng/L 以下とする。

感染性　HBs 抗原陰性、HCV 抗体および HIV 抗体不検出のもの。

試料を 1.5 mL ずつ充填し、直ちに-70 ℃以下に急速冷凍して保存する。ただし、試料の容量が多く充填が難しい場合は、バイアルを代えてもよい。

５‐３値付けの方法

基準分析法である同位体希釈質量分析法により値付けされたイオン電極用リチウム一次標準血清（Lot.L91-1）を校正用標準物質として、実用基準分析法であるフレーム光度法で測定した。ReCCS にて実施した。

６．今後の課題

本結果より、血清リチウム測定値に関しては、現状においても高い収束性があり、さらに実試料標準物質候補品を確立・使用することで、一層のデータ収束が予想される。ただし、試薬・機器メーカーは日本国内だけでなく、世界的に製造・販売を行っているメーカーが多く、国際的な認証を得ることが必要と考えられる。

また、本検討を行う中で、リチウムイオンが入った実検体を入手できなかったため、リチウムイオンを添加したプール血清で代用した。実検体確保方法が望まれる。

７．結び

17 年度：国内各種サーベイランスの対象となっていないことから、具体的な互換性について認識されていなかった。互換性の確認と、実試料標準物質候補品での有用性の確認を行い、現在でも高い収束性があるが、さらに実試料標準物質候補品を確立・使用することで、一層のデータ収束が予想された。

18 年度：実試料標準物質候補品の濃度設定とマトリックス確認を行い、有用性が確認された。試薬・機器メーカーのみならず、検査センターまで検討を拡大して、収束性の確認を行った。

19 年度：18 年度に作成した実試料標準物質候補品の保存検討を行い、安定性が確認された。

３年間の研究により、血清リチウムの実試料標準物質候補品の有用性は実証され、組成的にも一応の確立ができ、安定性の確認もできたと考えられる。

謝辞

検討に必要な試料のご提供とご助言を戴いた昭和大学病院臨床検査部高木康教授に深謝致します。

添付資料

施設	方法	温度	期間	濃度	測定値					平均	ＳＤ	ＣＶ
Ａ社	色素	-７０ ℃	０ヶ月	レベル１	0.77	0.77	0.76			0.77	0.006	0.75
				レベル２	1.06	1.08	1.07			1.07	0.010	0.93
				レベル３	1.76	1.73	1.75			1.75	0.015	0.87
			１ヶ月	レベル１	0.74	0.75	0.74	0.75	0.75	0.75	0.005	0.73
				レベル２	1.05	1.06	1.04	1.05	1.04	1.05	0.008	0.80
				レベル３	1.74	1.73	1.70	1.71	1.72	1.72	0.016	0.92
			３ヶ月	レベル１	0.78	0.78	0.79	0.78	0.79	0.78	0.005	0.70
				レベル２	1.08	1.08	1.08	1.09	1.08	1.08	0.004	0.41
				レベル３	1.78	1.79	1.78	1.79	1.79	1.79	0.005	0.31
			９ヶ月	レベル１	0.77	0.76	0.77	0.78	0.77	0.77	0.007	0.92
				レベル２	1.06	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	0.009	0.83
				レベル３	1.76	1.76	1.77	1.77	1.77	1.77	0.005	0.31
			１２ヶ月	レベル１	0.70	0.69	0.69	0.67	0.65	0.68	0.020	2.94
				レベル２	0.95	0.97	0.96	0.96	0.95	0.96	0.008	0.87
				レベル３	1.71	1.70	1.70	1.70	1.71	1.70	0.005	0.32

施設	方法	温度	期間	濃度	測定値					平均	ＳＤ	ＣＶ
Ａ社	色素	-２０ ℃	０ヶ月	レベル１	0.77	0.77	0.76			0.77	0.006	0.75
				レベル２	1.06	1.08	1.07			1.07	0.010	0.93
				レベル３	1.76	1.73	1.75			1.75	0.015	0.87
			１ヶ月	レベル１	0.75	0.74	0.75	0.71	0.74	0.74	0.016	2.23
				レベル２	1.04	1.04	1.05	1.06	1.07	1.05	0.013	1.24
				レベル３	1.75	1.75	1.74	1.73	1.75	1.74	0.009	0.51
			３ヶ月	レベル１	0.78	0.78	0.79	0.78	0.79	0.78	0.005	0.70
				レベル２	1.10	1.08	1.06	1.09	1.10	1.09	0.017	1.54
				レベル３	1.77	1.77	1.78	1.77	1.79	1.78	0.009	0.50
			６ヶ月	レベル１	0.79	0.78	0.78	0.79	0.78	0.78	0.005	0.70
				レベル２	1.07	1.09	1.08	1.09	1.07	1.08	0.010	0.93
				レベル３	1.77	1.79	1.78	1.80	1.78	1.78	0.011	0.64
			９ヶ月	レベル１	0.77	0.78	0.79	0.77	0.78	0.78	0.008	1.08
				レベル２	1.07	1.09	1.08	1.05	1.12	1.08	0.026	2.39
				レベル３	1.76	1.78	1.79	1.77	1.77	1.77	0.011	0.64
			１２ヶ月	レベル１	0.70	0.67	0.67	0.67	0.66	0.67	0.015	2.25
				レベル２	0.97	0.98	0.96	0.97	0.97	0.97	0.007	0.73
				レベル３	1.67	1.69	1.70	1.69	1.68	1.69	0.011	0.68

添付資料

施設	方法	温度	期間	濃度	測定値					平均	ＳＤ	ＣＶ
Ａ社	電極	-７０ ℃	０ヶ月	レベル１	0.86	0.86	0.86			0.86	0.000	0.00
				レベル２	1.16	1.16	1.16			1.16	0.000	0.00
				レベル３	1.86	1.87	1.87			1.87	0.006	0.31
			１ヶ月	レベル１	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87	0.87	0.000	0.00
				レベル２	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	1.17	0.000	0.00
				レベル３	1.88	1.87	1.88	1.87	1.88	1.88	0.005	0.29
			３ヶ月	レベル１	0.85	0.85	0.84	0.85	0.84	0.85	0.005	0.65
				レベル２	1.14	1.15	1.14	1.14	1.14	1.14	0.004	0.39
				レベル３	1.87	1.87	1.86	1.88	1.87	1.87	0.007	0.38

施設	方法	温度	期間	濃度	測定値					平均	ＳＤ	ＣＶ
Ａ社	電極	-２０ ℃	０ヶ月	レベル１	0.86	0.86	0.86			0.86	0.000	0.00
				レベル２	1.16	1.16	1.16			1.16	0.000	0.00
				レベル３	1.86	1.87	1.87			1.87	0.006	0.31
			１ヶ月	レベル１	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86	0.000	0.00
				レベル２	1.17	1.16	1.17	1.17	1.17	1.17	0.004	0.38
				レベル３	1.89	1.88	1.88	1.89	1.89	1.89	0.005	0.29
			３ヶ月	レベル１	0.84	0.84	0.84	0.84	0.85	0.84	0.004	0.53
				レベル２	1.12	1.12	1.12	1.14	1.14	1.13	0.011	0.97
				レベル３	1.85	1.84	1.84	1.85	1.85	1.85	0.005	0.30

施設	方法	温度	期間	濃度	測定値					平均	ＳＤ	ＣＶ
Ｂ社	電極	-７０ ℃	０ヶ月	レベル１	0.84	0.84	0.84			0.84	0.000	0.00
				レベル２	1.13	1.14	1.13			1.13	0.006	0.51
				レベル３	1.84	1.83	1.85			1.84	0.010	0.54
			１ヶ月	レベル１	0.84	0.84	0.85			0.84	0.006	0.68
				レベル２	1.13	1.14	1.14			1.14	0.006	0.51
				レベル３	1.81	1.82	1.82			1.82	0.006	0.32
			３ヶ月	レベル１	0.87	0.87	0.87			0.87	0.000	0.00
				レベル２	1.15	1.16	1.16			1.16	0.006	0.50
				レベル３	1.82	1.80	1.81			1.81	0.010	0.55
			６ヶ月	レベル１	0.87	0.89	0.90			0.89	0.015	1.72
				レベル２	1.20	1.21	1.19			1.20	0.010	0.83
				レベル３	1.82	1.84	1.85			1.84	0.015	0.83

施設	方法	温度	期間	濃度	測定値					平均	ＳＤ	ＣＶ
Ｃ社	色素	-７０ ℃	０ヶ月	レベル１	0.85	0.84	0.82			0.84	0.015	1.83
				レベル２	1.13	1.12	1.12			1.12	0.006	0.51
				レベル３	1.85	1.85	1.90			1.87	0.029	1.55
			１２ヶ月	レベル１	0.79	0.81	0.80			0.80	0.010	1.25
				レベル２	1.08	1.09	1.12			1.10	0.021	1.90
				レベル３	1.81	1.78	1.82			1.80	0.021	1.15

2-2-3-20　HDL コレステロール、LDL コレステロール測定用血清標準物質

本 HDL コレステロール、LDL コレステロール測定用血清標準物質についてのプロトタイプの作製については、有限責任中間法人 HECTEF スタンダードレファレンスセンター(現有限責任中間法人検査医学標準物質機構)が行った。

要旨

1）HDL コレステロールおよび LDL コレステロール測定用血清標準物質を作製した。

2）本血清標準物質のベース血清は、NCCLS（現 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute）のドキュメント（CA37-A）による調製ならびにバリデーション(validation：妥当性確認)の方法にしたがってヒト新鮮血清を用いて調製し、さらに日常検査法でコミュータビリティ(commutability：互換性)のあることを確認した。

3）HDL-C および LDL-C の値付けは、CDC（Center for Disease Control and Prevention:アメリカ疾病予防センター）のレファレンス法によった。

4）値付けの作業は、国際 3 機関（アメリカのワシントン大学ノースウエスト脂質代謝・糖尿病研究所、カナダのカナダ外部精度評価研究所、日本の（有限責任中間法人）検査医学標準物質機構（ReCCS)による共同実験によった。

5）本血清標準物質を、現状の LDL-C 測定の直接法である日常検査法に適用した場合の予備的な結果は、直接法 11 キットについて、本血清標準物質を測定試料として直接測定したところ、測定値の相対バイアスの大きさは順に-7.2%、-5.7%、-4.1%,-2.6%、-2.3%、-1.8%（3 キット)、-1.1%、0.5%、2.0%であった。±5%以内がキットの許容限界とすると、9 キットはメーカーでの標準測定操作法を介さなくても精確さが維持されていた。

6）本血清標準物質は、メーカーの基準とする測定操作法の親として用いるが、最終的な精確さの伝達は、メーカーのキットの添付文書に従う。

序文

J1WG での血清標準物質候補品から選択した標品について、HECTEF スタンダードレファレンスセンター(現検査医学標準物質機構(Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards : ReCCS)の協力により、HDL コレステロールおよび LDL コレステロール測定用血清標準物質を作製した。

2008 年４月から実施さる特定健康診査（特定健診）では、LDL コレステロール（low density lipoprotein-cholesterol：LDL-C）は直接法での測定によることになっている。そのためには測定の精確さの基準となる血清標準物質の設定が必要である。

今回、NEDO（(独）新エネルギー・産業技術総合開発機構）による臨床検査用標準物質の研究開発の一環として、HDL-C および LDL-C 測定用標準物質検討グループ（J1WG）の中で、LDL-C 測定用血清標準物質を設定した。

方法および結果

図 1 に HDL-C および LDL-C 測定のためのトレーサビリティ連鎖図を示した。HDL-C および LDL-C の測定法の基準は CDC（Center for Disease Control and Prevention:アメリカ疾病予防センター）のレファレンス法である。このうち HDL-C については、超遠心分離処理後のボトム画分について、ヘパリン-Mn 処理後の上清画分、および LDL-C については、ボトム画分のトータルのコレストロール値から、先の求めた HDL-C 値を差し引くベータ定量法(beta quantification method：BQ 法)である[1)]。

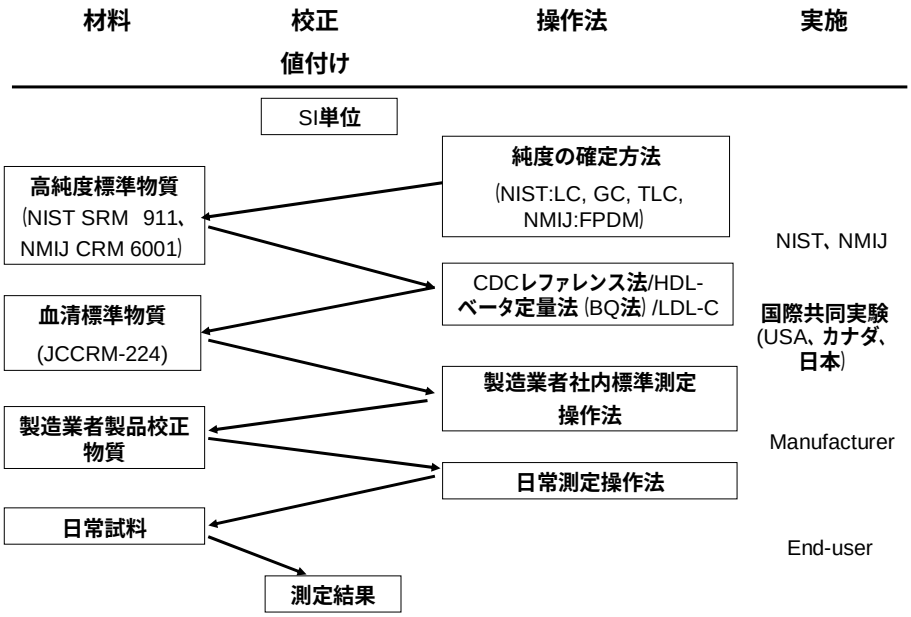


図1 HDL-CおよびLDL-C測定のトレーサビリティ連鎖図

この方法による HDL-C および LDL-C 値の測定概要を図 2 に示した。これは HDL-C の定量と組み合わせて構成されている。5ml の血清標準物質候補品に 1.0ml の密度 1.006 kg/L を加え、超遠心分離（40,000rpm、10 ℃、18.5 時間）後にカイロミクロン（CM）および VLDL 画分を除去し、ボトム画分(IDL＋LDL＋HDL)を得た。このボトム画分2.0 mL にヘパリン-Mn{80 μL ヘパリン(5,000 IU/mL)、100 μL $MnCl_2$（1.0 mol/L）}を添加し、選択的沈殿分離により LDL 画分（IDL＋LDL）を遠心（1500g、4 ℃、30 分）除去し、上清の HDL 画分のコレステロール量(HDL-C)をアベル・ケンダール法で測定した。次いで同様に密度 1.006 kg/L による超遠心分離処理後のボトム画分（IDL+LDL＋HDL）のコレステロール量（IDL-C＋LDL-C＋HDL-C）を求めて、先に求めた HDL-C 量を差し引いて LDL-C 量{LDL-C=〔(IDL-C＋LDL-C＋HDL-C) -1.09 x（HDL-C)〕}を算出した。ここで計算式の右辺の第 2 項の係数 1.09 は、ボトム画分のヘパリン-Mn 処理時の希釈補正値である。本法での LDL-C 値には IDL 画分も含まれる。

コレステロールの定量に用いる標準物質は、高純度標準物質のコレステロールである。これには NIST(National Institute of Standards and Technology：アメリカ標準技術研究所)の

SRM(Standard Reference Material) 911 や NMIJ(National Metrology Institute Japan：(独)産業技術総合研究所計量標準総合センター)の CRM 6001 などがあるが、今回は NIST SRM911b を用いた。

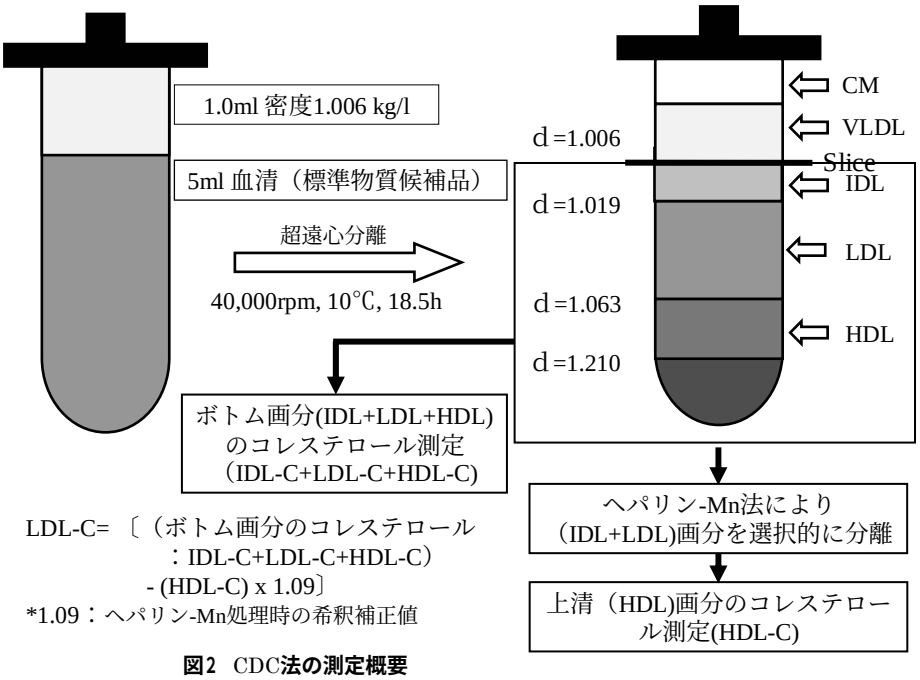


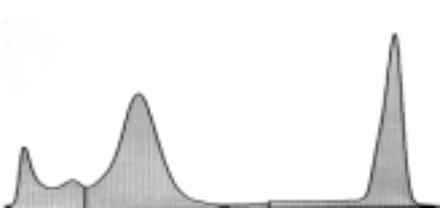
図2　CDC法の測定概要

また、本血清標準物質のベース血清は、NCCLS（現 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute）のドキュメント（CA37-A）による調製ならびにバリデーション(validation：妥当性確認)の方法[2)]にしたがってヒト新鮮血清を用いて調製し、さらに日常検査法でコミュータビリティ(commutability：互換性)のあることを確認した。

本血清標準物質の特性を表 1 に示した。これは血清標準物質（JCCRM 224-2）の血清の主な性状である。測定値はいずれも日常検査法によるものである。このうち CLSI のドキュメント（CA37-A）では規格が設定されている。その結果、規定項目のすべてについて規格内であることを確認した。さらに本血清標準物質のリポ蛋白のディスク電気泳動およびアガロース電気泳動結果を図３に示した。その結果、新鮮血清の状態を維持していた。

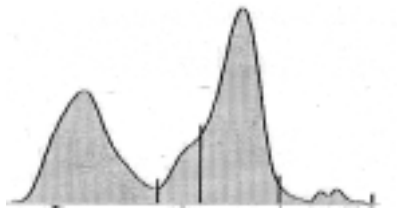
表1　血清の主な性状とCLSI CA37-Aの成分規格

項目	測定値	単位	測定法	CA37-A規格
TP	7.5	g/dl	Biuret法	5.8～8.0
ALB	4.5	g/dl	BCG法	—
A/G	1.5	—	—	＞1.0
NEFA	0.5	mEq/l	酵素法	—
Lp(a)	13	mg/dl	LA	—
apo E	4.2	mg/dl	TIA	—
アンモニア	87	μmol/l	酵素法	—
GLU	102	mg/dl	酵素法	＞60
UA	4.7	mg/dl	酵素法	—
T-BIL	0.5	mg/dl	バナジン酸酸化法	＜1.5
Hb	4以下	mg/dl	吸光光度法	＜30
吸光度	Abs0.05	—	吸光光度法(710nm)	＜0.5
TCHO	207	mg/dl	酵素法	—
HDL-C	60	mg/dl	酵素法	—
TG	82	mg/dl	酵素法	—
LDL-C	131	mg/dl	Friedewald式	—
IDL	認めず	—	ディスク電気泳動法	—



ディスク電気泳動

リポタンパク分画	単位	JCCRM 224-2
VLDL	%	16
LDL	%	47
HDL	%	36



アガロースゲル電気泳動

リポタンパク分画	単位	JCCRM 224-2
α	%	39
preβ	%	10
β	%	48
other	%	3

図3　電気泳動結果(JCCRM 224-2)

HDL-Cの測定結果を表２に示した。aはCDCのレファレンス法による国際共同実験の結果である。すなわちアメリカのワシントン大学ノースウエスト脂質代謝・糖尿病研究所、カナダのカナダ外部精度評価研究所、日本の（有限責任中間法人）検査医学標準物質機構（ReCCS)の 3 機関で、3 日間の測定を行った。このうち日本の測定者は 2 名が担当した。ｂはロット JCCRM 224-2 についての認証値である。c は共通試料を用いた測定技術評価である。認証は HECTEF SRC が行った。また、同様に LDL-C の測定結果を表３に示した。a は BG 法による国際共同実験の結果である 3 機関で 3 日間の測定を行った。このうち日本の測定者は 2 名が担当した。ｂはロット JCCRM 224-2 に

ついての認証値である。c は ReCCS における測定技術評価である。すでに NIST SRM 1951b として血清標準物質が設定されているので、それを用いた。HDL-C および LDL-C の認証値は CDC のリファレンス法により CDC が設定している。ただし本標準物質の性状が混濁血清であり、リポ蛋白の変性があることから日常検査に用いている直接法には適用できない。しかし CDC のリファレンス法による認証値を有することから、CDC のリファレンス法の測定技術評価に用いることができる。その結果は、バイアイスとして-1.4%であり、認証値の不確かさ以内であった。

表2 HDL-C測定用血清標準物質の値付け結果および測定技術評価
a:CDCレファレンス法による国際共同実験結果

	アメリカ(ワシントン大学)			カナダ(カナダEQA研究所)			検査医学標準物質機構(ReCCS)					
超遠心チューブ	A	B	C	A	B	C	A1	B1	C1	A2	B2	C2
HDL-C(mg/dl)	60.7	59.8	59.8	59.9	59.2	59.9	60.5	60.5	60.5	61.0	60.7	60.7
n	2	2	2	2	2	2	6	6	6	6	6	6
総平均値(mg/dl)	60.10			59.67			60.50			60.80		

b:認証値(JCCRM 224-2)

HDL-C	60.3±0.9 mg/dl
不確かさ	拡張不確かさ(95%信頼区間)、安定性の成分を含む

c:共通試料(凍結新鮮血清)を用いた共同実験による技術評価試験結果

	アメリカ	カナダ	ReCCS
測定値 (mg/dL) (n=4)	61.9	62.0	62.1

表3 LDL-C測定用血清標準物質の値付け結果、測定技術評価および血清の主な性状とCLSI CA37-Aの成分規格
a:CDCレファレンス法による国際共同実験結果

	アメリカ(ワシントン大学)			カナダ(カナダEQA研究所)			検査医学標準物質機構(ReCCS)					
超遠心チューブ	A	B	C	A	B	C	A1	B1	C1	A2	B2	C2
LDL-C(mg/dl)	131.1	130.9	130.4	128.6	129.1	129.2	131.0	130.0	130.8	130.6	131.7	131.9
n	2	2	2	2	2	2	6	6	6	6	6	6
総平均値(mg/dl)	130.80			128.97			130.60			131.40		

b:認証値(JCCRM 224-2)

LDL-C	130.4±2.1 mg/dl
不確かさ	拡張不確かさ(95%信頼区間)、安定性の成分を含む

c:測定技術評価(ReCCS)

NIST SRM 1951b I	
CDC認証値	LDL-C 113.2±3.1 mg/dl (110.1～116.2 mg/dL)
ReCCS測定値(n=6) 平均値 ± 2SD	LDL-C 111.8 ±1.2mg/dl (110.6～113.0 mg/dL)

本血清標準物質の使い方は、図 1 に示したごとく製造業者社内標準測定操作法の親として用いるものである。そしてこのメーカーでの社内測定操作法を通して製造業者製品校正物質（キャリブレータ）が設定され、これを用いた直接法による日常測定操作法（日常検査法）が行われる。予備的に日常検査法 11 キットについて、現状のままでの測定の精確さを、本血清標準物質を測定試料として直接測定したところ、測定値の相対バイアスの大きさは順に-7.2%、-5.7%、-4.1%,-2.6%、-2.3%、-1.8%（3 キット）、-1.1%、0.5%、2.0%であった。±5%以内がキットの許容限界とすると、

9 キットはメーカーでの標準測定操作法を介さなくても精確さが維持されていた。なお、最終的な精確さの伝達は、メーカーのキットの添付文書に従うことになる。

今回設定した血清標準物質の認証機関である ReCCS は、NITE（(独）製品評価技術基盤機構）による ISO/IEC 17025 および ISO ガイド 34 の認定取得機関であり、我が国の認定計量標準供給機関の一つになっている。さらに、脂質関係については、総コレステロール、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールの標準物質の値付けについて(独)製品評価技術基盤機構)による ASNITE の認定を受けている。なお、(有限責任中間法人）検査医学標準物質機構(Reference Material Institute for Clinical Chemistry Standards : ReCCS)は、本年１月から HECTEF スタンダードレファレンスセンター(HECTEF SRC)の名称が変更になったものである。

文献

1) Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH.Handbook of Lipoprotein Testing, 2nd Ed.pp221-263, AACC Press, 2000.

２）NCCLS C37-A. Preparation and validation of commutable frozen human serum pools as secondary reference materials for cholesterol measurement procedures; Approved guideline. 1999

2-2-4　国際標準化への対応

要旨
1）新たに設定された実試料標準物質について JCTLM へノミネーションするために必要な文書の英文化の作業を行う。
2）文書の英文化は、値付けの方法、認証書および取扱説明書についてであり、グリコアルブミン、血清鉄、尿素窒素、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールの測定項目である。
3）JCTLM へのノミネーション Cycle Ⅴへは、グリコアルブミン、血清鉄、尿素窒素、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールについて予定する。

1．目的

2002 年 BIPM（国際度量衡局）において、BIPM と IFCC の共催で「Symposium on Traceability in Laboratory Medicine」と称する国際会議が開催された。参加団体はヨーロッパ、米国、日本における臨床検査医学に関係する政府機関、学会、標準物質供給機関および関連企業団体等であった。日本からは厚生労働省、経済産業省、産業技術総合研究所、日本臨床化学会、福祉・医療技術振興会および（社）日本臨床検査薬協会等の代表者が参加した。
この会議において、検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会（JCTLM）が発足することが合意された。主たる内容はトレーサビリティをとる標準物質の設定である。発起機関は４つの国際的および政府間の推進母体として、BIPM/CIPM (Bureau international des poids et measures:国際度量衡局/Comite international des poids et mesures：国際度量衡委員会)、IFCC、WHO、ILAC （International Laboratory Accreditation Cooperation：国際試験所認定機構）であり、これに参加各国の協力機関で推進する。

本活動を通して、患者のための保健医療（Healthcare）の質の向上、繰り返し検査の減少と保健医療の効率性の向上によるコストの削減、IVD 企業のためのコスト削減、地域標準の統一化による重複した規格の除去、測定と検査のグローバルな承認を通して貿易の技術的障壁の除去などを図る。

具体的に標準化を推進する方法として、原則的には認証標準物質（Certified Reference Materials: CRM）および基準測定操作法（Reference Measurement Procedure: RMP）が存在し、それらを使用して基準測定検査室（Reference Measurement Laboratories: RML）が測定した測定値を介して、各国・各地域の RML が相互に標準化の確立を行うことである。

2．検討内容

日本臨床化学会の糖尿病関連指標専門委員会（委員長富永真琴）および有限責任中間法人検査医学標準物質機構において進められてきた標準物質の設定作業について、値付けの方法、標準物質の認証書および取扱説明書の各文書を英文化する。

３．結果

JCTLM ノミネーションの準備状況を表１に示した。このうち JCTLM へのノミネーション Cycle V へは、グリコアルブミン、血清鉄、尿素窒素、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールについて予定する。

表1　JCTLMへのノミネーションの準備状況

測定項目	値付けの方法	認証書･取扱説明書	ノミネーション：Cycle V
グリコアルブミン	○	○	○
血清鉄	○	○	○
尿素窒素	○	○	○
ＨＤＬコレステロール	○	○	○
LDLコレステロール	○	○	○

４．今後の課題

JCTLM へのノミネーションについては、今後、標準物質の設定がなされた段階で順次行うこととした

５．まとめ

設定された実試料標準物質について JCTLM へノミネーションするために必要な文書の英文化の作業を値付けの方法、認証書および取扱説明書について、グリコアルブミン、血清鉄、尿素窒素、HDL コレステロールおよび LDL コレステロールについて行う。

2-3　純物質系標準物質の研究開発

要旨
1）C 反応性蛋白標準物質については、値付けを実施し、標準物質を完成させた。
2）アルブミン標準物質については値付けのための測定法としてのアミノ酸分析法を確立した。また、標準物質開発に向けての課題の抽出を行った。
3）コルチゾール標準物質に関しては、値付けの基準とする高純度標準物質を開発し、不純物の同定定量からの値付け法を確立した。また、供給に必要な量を確保できる純度の高い候補品を開発し、高純度標準物質からの値付け技術として同位体希釈質量分析法を確立した。

2-3-1　研究背景

産業技術総合研究所計量標準総合センターでは、定量分析の基準となる標準物質の開発を進めており、臨床検査分野についても、トレーサビリティ体系の最上位の位置づけを担う純物質系標準物質として、コレステロール、クレアチニン、尿素等の標準物質開発を行ってきた。これらの低分子の有機化合物については、国際度量衡委員会／物質量諮問委員会(CIPM/CCQM)で定義されている一次標準測定法によりトレーサビリティの確保されうる測定系の構築が可能であると考えられるが、現実には化合物ごとに適用可能な手法が限られるため、実際の開発に当たっては物質ごとに値付けの方法を選定し、決定していく必要がある。特に、臨床検査分野で測定対象である代謝物に代表される低分子の有機化合物は、熱的に不安定で、類似の化合物からの分離が困難等の化合物が多いため、標準物質開発における値付け方法に関しても十分な検討が必要である。一方、蛋白質などの生体高分子については、国際単位系（SI）トレーサブルな測定系を確立していくことが必要とされている。現状の一次標準測定法は蛋白質には直接的には適用できないため、SI トレーサブルといえる蛋白質標準物質は世界的にもまだほとんど例がなく、CIPM/CCQM においても、蛋白質の SI トレーサブルな定量方法に関する議論が行われているところである。

本研究では、C 反応性蛋白(CRP)、アルブミン、およびコルチゾールに関しての純物質系標準物質の開発を目指している。CRP およびアルブミンについては、蛋白質における国際単位系（SI）トレーサブルな測定体系について検討するとともに、それらを用いた純物質系標準物質の開発を目標にした。平成 19 年度は、CRP については、これまでの検討結果を踏まえて、値付けの方法を決定し、標準物質作製を行った。アルブミンに関しては、ヒト血清アルブミンについての修飾や夾雑蛋白質等の解析を実施し、候補品に必要な品質を明らかにするとともに、測定法を確立して SI トレーサブルな値付けを可能にすることを目指した。また、コルチゾールに関しては、一次標準測定法の直接的な適用が困難であることが明らかになったため、少量の高純度物質を基準として実際の供給品を値付けるスキーム、すなわち、基準とする高純度物質の調製と純度決定方法とそれに基づく実際の供給候補品の値付け方法の確立を行い、標準物質の値付けスキームとしての実用性についての評価を行った。

2-3-2　研究担当者

産業技術総合研究所計測標準研究部門
有機分析科バイオメディカル標準研究室
高津章子、加藤愛、加藤尚志、絹見朋也、藤井紳一郎、川口研
有機分析科　加藤健次

2-3-3　C 反応性蛋白

1．　これまでと今年度の検討内容

過去 2 年間においては主に、候補標準品の選定、安定性試験のための各種クロマトグラフィによる測定系の確立と予備安定性試験、値付け方法であるアミノ酸分析や窒素分析の予備的検討を行った。これまでの検討結果を踏まえて、本年度は標準物質作製に必要な残りの各種試験を行った。具体的には①候補標準物質の同定試験、②均質性評価、③安定性評価、④窒素分析およびアミノ酸分析による候補標準物質の特性値（濃度）の決定である。

2．　候補標準物質の同定試験

（1）　ウェスタンブロット解析

候補標準物質について、抗ヒト CRP 抗体（ポリクローナル、オリエンタル酵母工業社製）を用いたウェスタンブロット解析を行ったところ、CRP の分子量にほぼ一致する 25 kDa に単一バンドが観測され（図 1(a)）、候補標準物質は免疫化学的にヒト CRP と同一であることが示された。

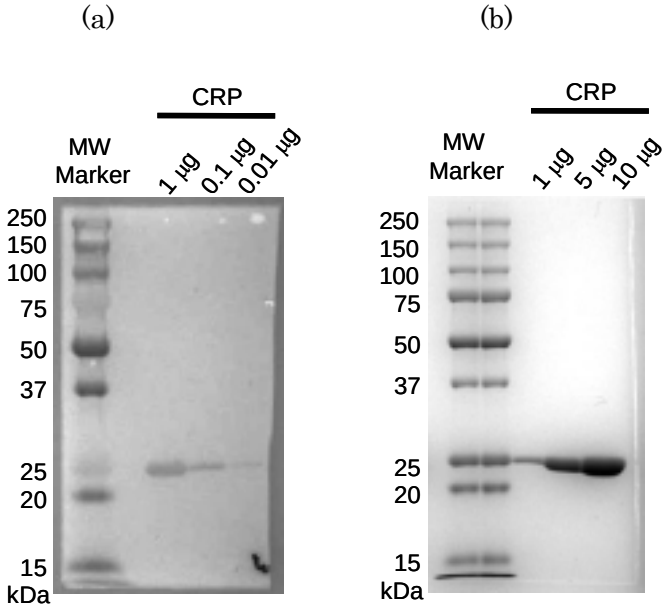


図 1 候補標準物質の(a)ウェスタンブロット、 (b)SDS-PAGE

（2）ペプチドマッピング

蛋白質をプロテアーゼにより加水分解を行うと、用いたプロテアーゼの基質特異性に応じたペプチド断片が得られる。一方、蛋白質の既知のアミノ酸配列から、プロテアーゼによる加水分解によって生じるペプチドを基質特異性に基づいて予想することが出来る。候補標準物質をプロテアーゼによる加水分解により得られたペプチドと、ヒト CRP のアミノ酸配列から予想されるプロテアーゼ消化ペプチドを比較した。その結果、ヒト CRP のアミノ酸配列のうち、トリプシン、Glu-C 消化ペプチドは CRP のアミノ酸配列のそれぞれ 36 %、53 %に一致する結果を得た。

（3） アミノ酸配列

候補標準物質のアミノ酸配列はオリエンタル酵母工業（株）により確認されている [1)]。それによれば、同配列は Swiss-Prot (http://www.expasy.org)の accession# P02741 に登録されているヒト CRP 配列からシグナル配列 1-18 を除いた配列と一致した。206 アミノ酸からなり、以下にそのアミノ酸配列を示す。

QTDMSRKAFVFPKESDTSYVSLKAPLTKPLKAFTVCLHFYTELSSTRGYSIFSYATKRQDNE
ILIFWSKDIGYSFTVGGSEILFEVPEVTVAPVHICTSWESASGIVEFWVDGKPRVRKSLKKG
YTVGAEASIILGQEQDSFGGNFEGSQSLVGDIGNVNMWDFVLSPDEINTIYLGGPFSPNVLN
WRALKYEVQGEVFTKPQLWP

（4） 血清精製品との比較

質量分析計により候補標準物質の質量測定を行った。測定は高速液体クロマグラフィー（島津製 20A シリーズ）、逆相カラム（Polymer Laboratory 製　PLRP-S）およびエレクトロスプレーイオン化質量分析計（サーモフィッシャー社製 TSQ Quantum）をオンライン接続したシステムで行った。質量分析計の質量校正はチロシン単量体、三量体、六量体で行った。得られた多価イオンから計算される 0 価の平均分子質量（分子量と等価）は、23028.6 ± 1.9 u であった（図 2）。一方、ヒト血清由来 CRP (Sigma-Aldrich、 C4063) について同様の測定を行うと、23028.1 ± 2.1 u であり、候補標準物質と一致した。また、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計での測定によってもそれぞれが一致する結果を得た。したがって候補標準物質の構造は血清精製品と同等と考えられる。

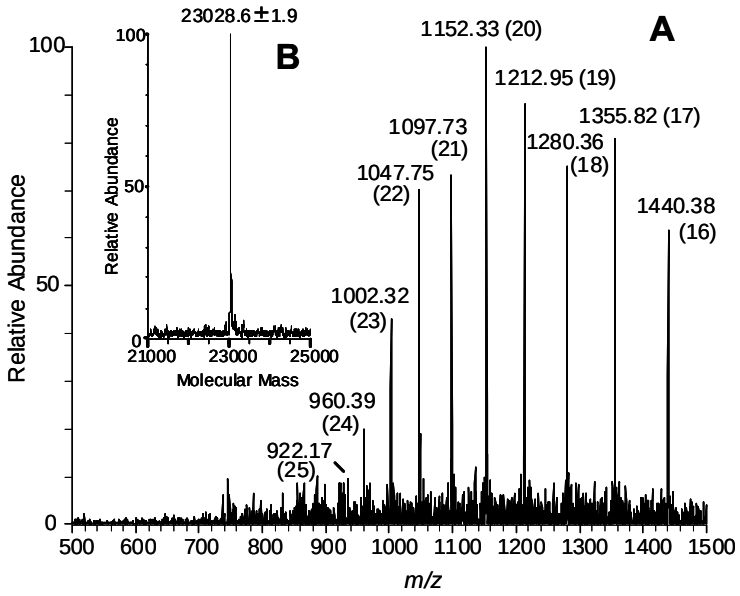


図 2 候補標準物質の質量スペクトル　(A)測定されたスペクトル（カッコ内はイオンの価数を示す)、(B)デコンボリューションしたスペクトル

（５） 一次構造解析

ヒト血清由来の CRP はN末端がピログルタミル化され、ジスルフィド結合を形成していることが報告されている [2]。候補標準物質について、N 末端由来トリプシン消化ペプチドの MS/MS 解析、およびピログルタミルアミノペプチダーゼ処理候補標準物質の N 末端配列解析を行い、N 末端のピログルタミル化を確認した。

ピログルタミル化およびジスルフィド結合を考慮したヒト CRP の分子量は 23028.1 と計算され、（４）で求めた値と一致する。したがって、候補標準物質は N 末端がピログルタミル化され、1 対のジスルフィド結合を形成している。

３． 候補標準物質の均質性評価

標準物質の均質性試験はゲルろ過高速液体クロマトグラフィによって行った。小分けされた 150 本の CRP 候補標準物質のボトルから 10 本を抜き取り、CRP のピーク面積測定を行った。均質性試験は各々のボトルについて 2 回ずつ測定を行った。CRP のピークについて各ボトルの測定面積値を表 1 に、またこの結果をもとに分散分析した結果を表 2 に示す。

分散分析において、分散比（= 2.19）＜ F 境界値(= 3.02)であり、ボトル間差は有意ではなかった。またボトル間の標準偏差として s_{bb} = 0.337 %を得た。なお、測定ばらつきに由来する値（ISO Guide 35、u_{bb}）は、0.206 %であった。今回の均質性試験においては、s_{bb} （= 0.337）＞u_{bb}（= 0.206）であったため、以上の結果より 0.337 %を均質性に由来する不確かさとして、特性値の不確かさに加えることにした。

表 1　均質性試験の測定結果

ボトル　No.	ピーク面積　(-) 1回目	2回目	ボトル内平均値	相対標準偏差（%）
#004	42323488	42667254	42495371	0.57
#007	42309712	42379492	42344602	0.12
#037	42829975	43064572	42947274	0.39
#049	42362012	42810796	42586404	0.75
#055	42443628	42501191	42472410	0.10
#100	42374569	42457870	42416220	0.14
#112	42384326	42595641	42489984	0.35
#121	42293310	42629226	42461268	0.56
#142	42687809	42993152	42840481	0.50
#148	42307969	42531919	42419944	0.37
ボトル間平均	42547396			
相対標準偏差(%)	0.55			

表 2　均質性試験の分散分析表

変動要因	変動	自由度	分散	分散比	P-値	F 境界値
ボトル間	6.819E+11	9	7.577E+10	2.19	0.118	3.02
ボトル内	3.453E+11	10	3.453E+10			
合計	1.027E+12	19				

４．　候補標準物質の安定性評価

候補標準品と同規格の CRP 溶液を予め 120 本調製し、認証前の安定性評価を行った。安定性試験はゲルろ過高速液体クロマトグラフィのピーク面積測定によって行った。4 ℃で保管した試料について 2 本ずつを定期的に抜き取り、各々のボトルについて 2 回ずつ測定を行った。検出器の日間の感度補正を行う目的で、アジ化ナトリウムの溶液を用時調製し外部標準液として面積値の補正を行った。CRP のピークについて各測定結果を表 3 に、プロット図を図 3 に、またこの結果をもとに回帰分析した結果を表 4 に示す。

回帰分析において、分散比(= 6.605) ＜ F 値(= 18.5)であり、近似直線の傾きは有意水準 5 % で有意ではないことから、本標準物質は安定であると言える。しかしながら本検定結果は自由度が非常に小さい条件下で得られたものであり、評価が的確に行われていない可能性がある。そこで傾きが有意であるとした場合、傾きをもとに求めた安定性に由来する不確かさは

（近似直線の傾き×100）＝　0.00047 × 100　＝　0.047 %

であることから、1 ヶ月あたりの安定性に由来する不確かさは最大限 0.047 %以内に収まるものとして以下の計算を行った。すなわち有効期限を 3 年とした場合の安定性試験に由来する不確かさは、

u_{lts}　＝　0.047　×　36 (month) = 1.702 (%)　である。

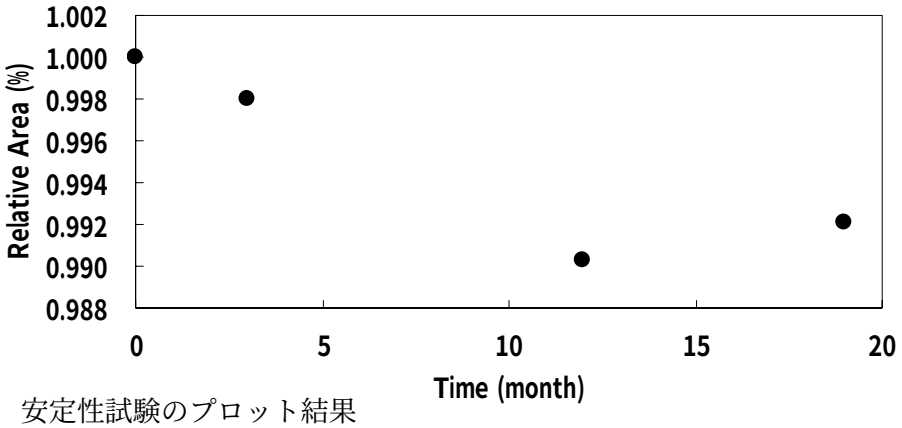


図３　安定性試験のプロット結果

表３　安定性試験の測定結果

Month	Relative Area (%)
0	1.000
3	0.998
12	0.990
19	0.992
平均	0.995

表４　安定性試験の回帰分析結果

	自由度	変動	分散	分散比	有意 F
回帰	1	4.97809E-05	5E-05	6.605	0.124
残差	2	1.50743E-05	7.5E-06		
合計	3	6.48552E-05			

	係数	標準誤差	t	P-値	下限 95 %	上限 95 %
切片	0.9991	0.00207	481.554	4.31E-06	0.990	1.008
X 値 1	-0.00047	0.00018	-2.570	0.124	-0.001	0.000

５．　特性値の決定

蛋白質などの生体高分子については、現状の一次標準測定法は直接的には適用できない。そこで現状で最も信頼性の高い蛋白質の定量法であるアミノ酸分析法や窒素分析法に着目し、中でもアミノ酸分析については同位体希釈質量分析法(IDMS)を適用することで、より信頼性の高い定量を目指した。認証値の決定にあたっては可能な限り原理の異なる測定法を組み合わせるとの観点から、アミノ酸分析と窒素分析の 2 つの方法での測定結果をもとに濃度を算出することにした。窒素分析においては溶液中の他の窒素化合物が含まれており、候補標準物質を直接測定することが出来なかった。そこで予め透析処理により、他の窒素化合物を含まない透析サンプルを用意し、この溶液を基準に候補標準物質の値付けを行った。値付けのスキームを図４に示す。

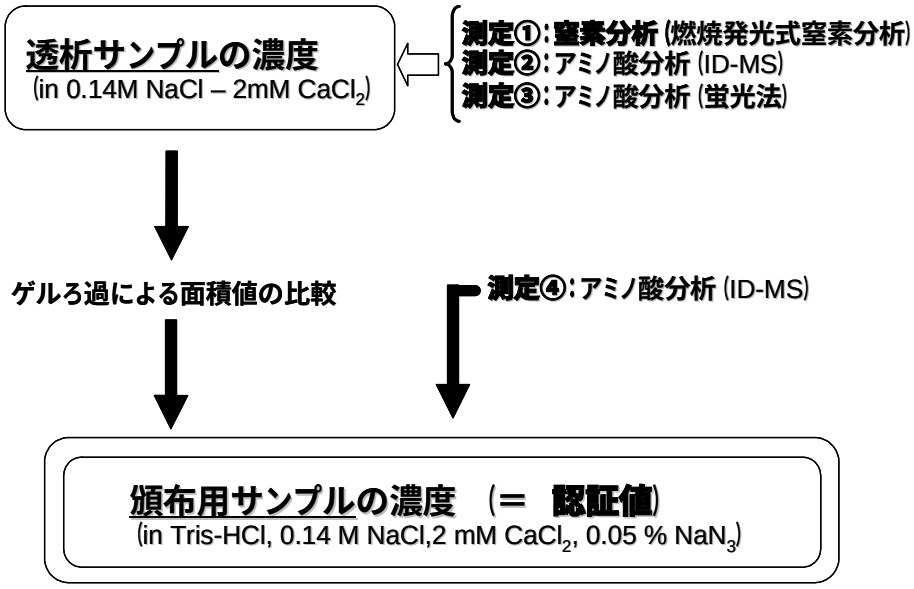


図 4　C 反応性蛋白標準物質の値付けのスキーム

（1） 窒素分析法

頒布用サンプル中にはタンパク質以外の窒素化合物が含まれるため、窒素分析は適用できない。そこで透析サンプルのみの窒素分析を行った。同法を用いたタンパク質濃度の定量においては、分析により得られた窒素濃度 (μg/kg) から

$$\text{CRP の定量値(μmol/kg)} = \frac{\text{窒素濃度(μg/kg)}}{\text{窒素の原子量} \times \text{CRP1分子に含まれる窒素原子数}}$$

とした。CRP 1 分子に含まれる窒素原子数は N 末端のピログルタミル化（3（5））を考慮し、「260」とした。

本測定に用いた標準液には硫酸アンモニウム水溶液を用いた。使用装置は燃焼発光式窒素分析計（ダイアインスツルメンツ製）および化学発光検出器 ASC-150（ダイアインスツルメンツ製）をガラス管およびテフロンチューブにより接続して用いた。測定条件は表 5 の測定条件を参照。測定結果を表 6 に示す。

表 5　燃焼発光式窒素分析の測定条件

		Conditions
Mode		Decompression
Accessory		ASC-150L
Gas flow	O_2	500 cm^3 / min
	O_3	200 cm^3 / min
Heater	Set temperature1	600 ℃
	Set temperature2	800 ℃
Injection		10 μL(solvent flush with 5 μL of MQ)
Range		Range 3
Integrate mode		Auto mode

表 6　窒素分析による値付け用透析サンプルの測定結果　（単位：μmol / kg）

ボトル番号	測定番号	1日目	2日目	3日目	ボトル内平均	標準偏差
#001	1	40.34	40.51	41.86	40.63	0.59
	2	40.38	40.23	41.58		
	3	39.81	40.91	41.71		
	4	40.26	40.93	40.54		
	5	40.54	40.07	40.62		
	6	-	40.40	40.05		
#008	1	40.31	40.83	41.28	40.64	0.75
	2	40.45	41.05	42.40		
	3	41.19	41.09	39.36		
	4	40.40	41.27	40.77		
	5	40.15	40.27	39.68		
	6	-	39.53	40.90		
#018	1	40.77	40.95	42.31	41.17	0.69
	2	41.05	40.88	41.38		
	3	41.17	41.23	42.21		
	4	41.87	41.59	40.16		
	5	40.65	41.09	42.37		
	6	40.04	40.98	40.43		
日内平均		40.59	40.77	41.09		
標準偏差		0.52	0.51	0.95		

以上の結果より、窒素分析による値付け用透析サンプルの CRP 濃度と標準不確かさと 40.81 ± 1.17 （μmol/kg）が得られた。

（2）アミノ酸分析法

アミノ酸分析によるタンパク質の定量においては、立体障害やアミノ酸そのものの安定性が原因で加水分解の段階においてアミノ酸間の回収率が違ってくるといった現象がある [3)]。そのため本測定においては、一般的に分解しやすいなどの問題があるとされるアミノ酸（セリン、トレオニン、イソロイシン、システイン、トリプトファン）と CRP 中に含まれる分子数の少ないアミノ酸（アルギニン、ヒスチジン、メチオニン）以外のアミノ酸を選択し、その定量値（μg/kg）から以下の式で CRP 濃度を求めた。

$$\text{CRP の定量値（μmol/kg）} = \frac{\text{アミノ酸の定量値（μg/kg）}}{\text{アミノ酸の分子量} \times \text{CRP1分子に含まれるアミノ酸分子数}}$$

アミノ酸標準液は Fluka 社製アミノ酸(リジン以外は Biochemika Ultra グレード、リジンは purum グレード)を用いて調製した。アミノ酸の純度測定として、日本工業規格（JIS）や日本薬局方に規定される非水滴定(過塩素酸酢酸溶液を用いた中和滴定（電位差滴定）)および、不純物測定として、誘導体化 HPLC-蛍光検出法による不純物として存在する他のアミノ酸の定量、逆相 HPLC-UV 法による不純物検出、水分測定（水分気化装置を用いたカールフィッシャー電量滴定法）を行い、純度の推定を行った。その結果、滴定法からは、リジンを除き純度はほぼ 100 %と

いう結果が得られ、不純物測定においてはリジン中の水分およびロイシン中のイソロイシンを除き、大きな不純物は検出されなかった。ただし、類似構造の不純物の同定・定量は必ずしも十分でないことが危惧されるため、メーカーの規格値も勘案して、最終的な純度と不確かさを決定した。

アミノ酸分析は、同位体希釈質量分析法と 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)誘導体化-蛍光法により定量を行った。試料に同位体標識アミノ酸もしくはα-アミノ酪酸を内部標準として添加した後、塩酸気相下において 145 ℃、6 時間加水分解した。同位体希釈質量分析法を利用したアミノ酸分析においては、フェニルアラニン、プロリン、バリン、ロイシン、アラニンを、蛍光法を利用したアミノ酸分析においてはフェニルアラニン、プロリン、バリン、ロイシン、アラニン、リジン、チロシンを定量した。測定条件は表 7、8 の測定条件を参照。

表 7　同位体希釈質量分析法の測定条件

	Conditions
Column	ZIC-HILIC (2.1 mm I.D. × 250 mm)
Column temperature	30 ℃
Solvent	A: 10 mM Acetic acid B: Acetonitrile (A/B = 75/25 (25 min) →A/B = 10/90 (30 min)→A/B = 75/25 (33 min))
Flow rate	0.1 mL/min
Detector	LC/MS-201-EV
Monitoring ion	90.00 (L-Alanine), 94.00 (Labelled-L-Alanine), 132.00 (L-Leucine), 139.00 (Labelled-L-Leucine), 165.95 (L-Phenylalanine), 176.00 (Labelled-L-Phenylalanine), 115.95(L-Proline), 122.00 (Labelled-L-Proline), 118.00 (L-Valine), 124.00 (Labelled L-Valine)
Injection volume	2 µL
Sample temperature	4 ℃
Time	88 min

表 8　蛍光法の測定条件

	Conditions			
Column	AccQ･Taq Column (3.9 mm I.D. × 150 mm)			
Column temperature	35 ℃			
Solvent	A: AccQ･Tag Eluent A (Waters) B: Acetonitrile C: Distilled water			
Gradient program	Time (min)	A %	B %	C %
	0.01	100	0	0
	0.5	99	1	0
	18	95	5	0
	19	91	9	0
	29.5	83	17	0
	33	0	60	40
	41	100	0	0
	50	100	0	0
Flow rate	1 mL/min			
Detector	Multi λ fluorescence detector 2475 (Waters) (Ex. = 250 nm, Em. = 395 nm)			
Injection volume	10 µL			
Sample temperature	4 ℃			
Time	50 min			

それぞれの測定法による CRP 濃度の測定結果を表 9、10 に示す。

表 9　IDMS による透析サンプルの測定結果　（単位：µmol / kg）

ボトル番号	加水分解番号	測定番号	Ala	Leu	Phe	Pro	Val
#001	1	1	38.86	41.17	40.28	39.09	38.93
	1	2	38.48	41.13	39.85	39.22	39.12
	2	1	38.69	41.11	39.99	39.42	39.36
	2	2	38.84	41.12	40.01	39.73	39.19
#008	1	1	38.40	41.09	39.88	39.26	38.84
	1	2	38.47	41.14	39.95	39.12	39.35
	2	1	38.28	40.06	39.31	38.76	38.19
	2	2	37.62	40.40	38.99	38.82	38.55
#018	1	1	37.92	40.12	39.17	38.79	38.37
	1	2	37.98	40.37	39.09	39.11	38.40
	2	1	36.91	39.37	38.30	38.42	38.59
	2	2	37.22	39.86	38.32	38.55	38.63
各アミノ酸毎の平均値			38.14	40.58	39.43	39.02	38.79
各アミノ酸毎の標準偏差			0.63	0.63	0.67	0.37	0.40

各アミノ酸から得られた結果の平均：39.19 (μmol/kg)

表 10　蛍光法による透析サンプルの測定結果　（単位：μmol / kg）

ボトル番号	加水分解番号	測定番号	Ala	Leu	Lys	Phe	Pro	Tyr	Val
#010	1	1	37.45	38.76	37.57	38.10	38.59	38.67	38.33
#010	1	2	38.12	39.06	38.87	38.44	38.88	39.40	38.88
#010	2	1	37.65	38.60	37.94	37.90	38.45	38.84	38.35
#010	2	2	38.09	39.14	38.84	38.42	38.78	39.35	38.78
#031	1	1	38.05	38.93	39.52	38.00	38.78	39.11	38.83
#031	1	2	38.01	38.91	39.39	37.98	38.64	39.10	38.69
#031	2	1	38.05	39.48	39.05	38.71	39.26	39.54	39.17
#031	2	2	37.72	38.95	38.78	38.14	38.84	39.01	38.68
#058	1	1	38.43	39.48	39.72	38.45	39.20	39.45	39.21
#058	1	2	38.12	38.88	39.61	37.86	38.63	38.85	38.66
#058	2	1	37.72	40.72	38.01	41.18	40.61	41.98	40.11
#058	2	2	38.24	41.03	38.47	41.42	40.69	42.25	40.43
各アミノ酸毎の平均値			37.97	39.33	38.81	38.72	39.11	39.63	39.01
各アミノ酸毎の標準偏差			0.28	0.77	0.70	1.24	0.76	1.19	0.65

各アミノ酸から得られた結果の平均：38.94 (μmol/kg)

６．　認証値の決定

それぞれの測定法における測定結果をまとめると

窒素分析による濃度値　　40.81 ± 1.17　(μmol/kg)　(*Rel. u* = 2.86 %)

同位体希釈質量分析法による濃度値　　39.19 ± 1.09　(μmol/kg)　(*Rel. u* = 2.77 %)

蛍光法による濃度値　　38.94 ± 0.849　(μmol/kg)　(*Rel. u* = 2.18 %)

が得られ、不確かさを考慮すると十分一致した結果が得られた。

以上を重み付け平均することにより、特性値　39.5　（μmol / kg）が得られた。

認証値の標準不確かさ u_{crm} (相対値)は、特性値に由来する不確かさ $u_{char,}$と均質性に由来する不確かさ u_{homo} 、安定性に由来する不確かさ u_{lts} を考慮して

$$u_{crm} = \sqrt{u_{char}^{2} + u_{homo}^{2} + u_{lts}^{2}} = 2.47\ \%$$

よって包含係数 $k = 2$ とすると、本標準物質の認証値と不確かさは

39.5 ± 1.9　（μmol / kg）

である。

なお、平均分子質量をもとに得られた、質量分率での濃度とその拡張不確かさは、

（0.91 ± 0.04）g/kg である。

７．　免疫学的定量法による既存標準物質との比較

サンドイッチ ELISA 法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay：酵素免疫測定法）により本標準物質を基準として、欧州の IRMM から供給されている標準物質 ERM-DA470 中の CRP 量を定量し、既存の CRM との値の互換性の確認を行った。ERM-DA470 は血清標準物質であるが、血清蛋白質の標準として広く用いられており CRP 濃度も認証されている。

本 CRP 標準物質で検量線を作成し ERM-DA470 中の CRP 濃度を算出した結果、39.2 µg/mL ± 4.9 µg/mL であった。この濃度は IRMM が認証している 39.1 ± 1.9 µg/mL とよく一致した。

８．　まとめ

リコンビナント C 反応性蛋白溶液について、アミノ酸分析（IDMS および蛍光法）と窒素分析により値付けを実施し、標準物質を完成させた。得られた認証値は 39.5 ± 1.9（µmol / kg）であった。本認証標準物質は NMIJ CRM 6201-a として 2008 年 5 月以降に頒布予定である。

2-3-4　アルブミン

１．はじめに

アルブミンはヒト血清からの精製品として得られ、標準候補品についても血清精製品を用いることとなる。したがって、アルブミン標準品の開発のためにはアルブミン精製品の純度の評価は重要な要素である。値付けに関しては、ウシ血清アルブミン（BSA）の認証標準物質（NIST）を用いてアミノ酸分析、窒素分析の条件を検討した。これらの純度評価、定量分析の結果から、候補標準品選定、値付けに関して留意すべき点が明らかとなった。

２．ヒト血清アルブミンの純度等の評価についての検討

昨年に引き続き液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS）によるヒト血清アルブミンの不均一性について検討を行った。アルブミンは塩や低分子化合物を非特異的に吸着する性質をもつため、脱塩精製が十分でなければ正確な質量測定ができない。また、分子量が大きいため同位体分布によるピークの広がりが大きく、アルブミンのアミノ酸側鎖の構造を解析するためには質量分析の分解能を高める必要がある。これらの点を考慮して逆相高速液体クロマトグラフィ（HPLC）および高分解能のエレクトロスプレーイオン化質量分析計によりヒト血清アルブミン測定を行ったところ、アルブミンの質量スペクトルは８本のピークに分離して観測された。インタクトのアルブミン分子は分子量の計算値 66437 にほぼ一致する 66438±4 に観測され、システイン修飾と考えられるピークが 66556±11 に観測された。グリケーションを受けたと考えられる修飾体のピークについても観測されたが、構造の完全な同定には至らなかった。

３．ウシ血清アルブミン（BSA）を用いた値付け方法についての検討

蛋白質の値付けには、アミノ酸分析、窒素分析が信頼できる方法として用いられており、アルブミンの値付けへの応用を検討した。アミノ酸分析については、安定同位体標識したアミノ酸を用いた IDMS、および 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)によるアミノ酸のプレカラム蛍光標識法による定量を行い、窒素分析に関しては、燃焼発光式窒素分析計を用いた。試料は、NIST より SRM927d として頒布されているウシ血清アルブミン（BSA）を用いて、その認証値と、アミノ酸分析、窒素分析での測定結果を比較した。

１）アミノ酸分析（IDMS）による結果

アミノ酸標準液は Fluka 社製アミノ酸（Biochemika Ultra グレード）を用いて調製した。^{13}C、^{15}N 標識したアミノ酸（アラニン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン、プロリン、バリン）を内部標準として 6 M HCl 気相中で 145 ℃、6 時間の加水分解を行った。ヒリックモードカラムを用いた LC/MS により測定を行い、各アミノ酸濃度から BSA の濃度を求めた。BSA の認証値を１としたときの定量値（回収率）は図 5 のようになり、総平均は 1.012±0.003 であった。

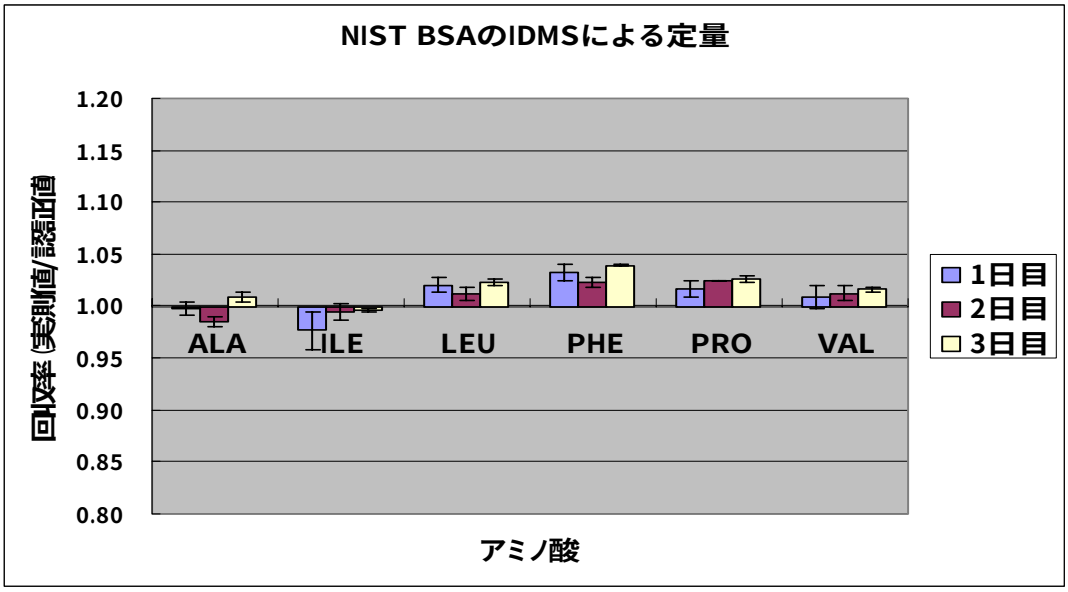


図 5　IDMS を用いたアミノ酸分析法による NIST ウシ血清アルブミン
標準物質の定量結果

2）アミノ酸分析（蛍光標識）による結果

アミノ酸標準液は IDMS と同様 Fluka 社製を用いて、α-アミノ酪酸を内部標準として 6 M HCl 気相中で 145 ℃、6 時間の加水分解を行った。AQC 試薬により蛍光標識を行い、逆相 HPLC による蛍光検出を行って定量した。

分解、酸化しやすいアミノ酸、BSA 1 分子に含まれる分子数が少ないアミノ酸、加水分解抵抗性を示すアミノ酸を計算から除外し、アラニン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、プロリン、チロシン、バリンの定量値をもとに BSA の濃度を求めたところ、BSA の認証値を 1 としたときの定量値（回収率）の平均は 1.011±0.017 であった。

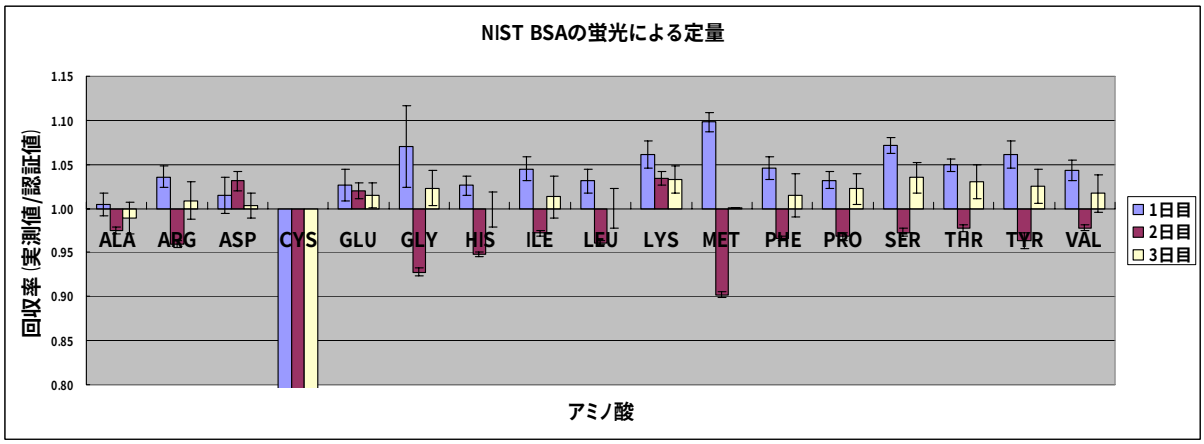


図 6　蛍光検出アミノ酸分析法による NIST ウシ血清アルブミン標準物質の定量結果

３）窒素分析による結果

硫酸アンモニウム水溶液を標準液として、燃焼式発光窒素分析計を用いて BSA の窒素濃度を測定した。この値から BSA の窒素原子数を用いて濃度を求めた。BSA の認証値を１としたときの定量値（回収率）は 1.007±0.026 であった。

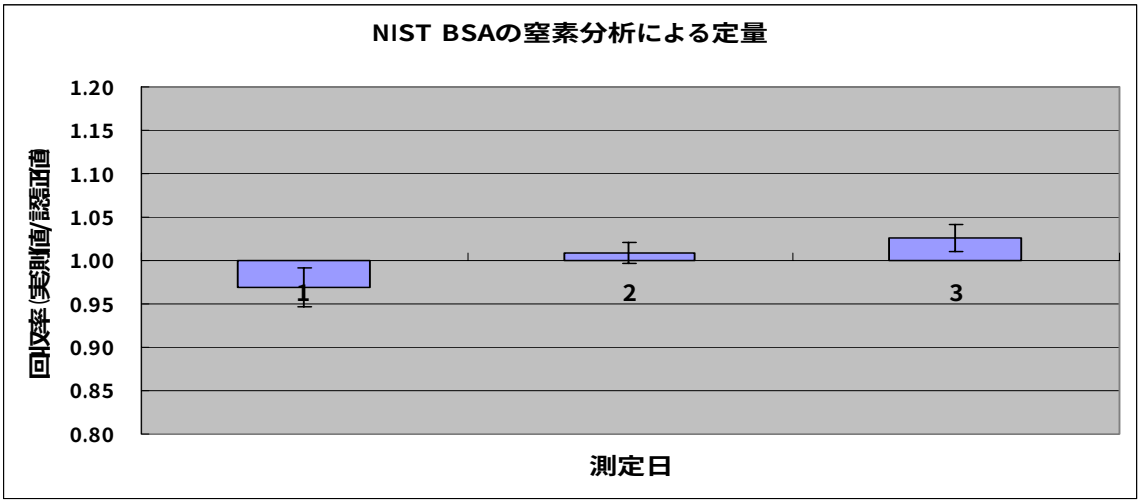


図 7　窒素分析法による NIST ウシ血清アルブミン標準物質の定量結果

４）定量のまとめ

アミノ酸分析は、IDMS、蛍光標識法ともに認証値と不確かさの範囲で一致するとともに、窒素分析の結果を含め、いずれもよい一致を示した。アミノ酸分析では、加水分解条件の設定、濃度の計算に用いるアミノ酸の選択が結果に大きな影響を与える。認証標準物質を用いた比較検討により、ここで用いた 6 M HCl 気相中で 145 ℃、6 時間で十分に加水分解が行われていることが分かった。また、蛍光標識によるアミノ酸分析、窒素分析では日間差が大きく、日間差の低減が精度向上に大きく寄与することが明らかとなった。

４．標準物質開発に向けての課題

アルブミンは様々な分子と結合し、血流によってこれらの分子を運搬する生理的な機能をもっている。しかし、この性質は、精製が困難であること、器具、機器への吸着が起こりやすいといった問題の原因となる。アルブミンの実験器具への吸着を最小限に抑えるために、使用する容器の選定、希釈に用いる緩衝液の検討を行い良好な定量結果を得た。水-アセトニトリル系の逆相 HPLC による連続測定を行ったとき、アルブミンのピーク面積は測定を繰り返すごとに減少した。この現象はトリプトファンやフェニルアラニンを内部標準としても十分に補正出来ず、１０回繰り返し測定でピーク面積は１０分の１程度まで減少した。有機溶媒を多く含む溶媒系での吸着と考えられたことから、安定性、均質性の試験にはゲル濾過やイオン交換カラムを用いた緩衝溶液系でのクロマトグラフィの使用を検討する必要がある。

また、候補品選定に関して、不均一性の程度（質量スペクトルでの修飾体のピーク強度の分布）がロット毎で異なることが報告されており、アルブミン標準候補物質選定時に不均一性の程度を

評価しておく必要がある。SDS-PAGE により四量体まで観測されており、ゲル濾過クロマトグラフィーなどによる多量体の除去についても検討しておく必要がある。

アルブミンの翻訳後修飾は、アミノ酸側鎖のシステイン化に加え、N末端、C末端のトランケーションが報告されており、これらはアルブミン分子の不均一性の原因となる。しかし、IDMS、蛍光標識法によるアミノ酸分析はよい一致を示したこと、およびヒト血清アルブミンは 585 アミノ酸からなる巨大分子であるため、翻訳後修飾による不均一性はアミノ酸分析の結果にはほとんど影響はないと考えられる。ヒト血清アルブミンについても、今回検討したウシ血清アルブミンと同様の方法により精確な値付けが可能であると考えられる。

2-3-5　コルチゾール

１．これまでの検討内容

コルチゾールの純物質標準物質の開発にあたっては、一次標準測定法による直接的な純度測定は困難であり、少量の高純度物質を調製し、不純物定量から純度を算出した上で、それを基準として供給品に純度値をつけるスキームが現実的な対応策であると考えられた。そこで、今年度は、基準とする高純度品の調製と純度決定のための不純物等の解析および実際の供給候補品の選定および高純度品に基づく値付け方法の確立を行い、標準物質の値付けスキームとしての実用性についての評価を行った。

２．精製コルチゾール調製の検討

高速液体クロマトグラフィ(HPLC)を用いて試薬グレードのコルチゾールを分析したところ、クロマトグラム上に多数のピークがみられ、類似のステロイド化合物が不純物として多種類含有されていると考えられたため、分取カラムを用いた精製および再結晶による精製について検討した。このうち、分取カラムによる精製は、類似ステロイド化合物をより効果的に除去できると考えられ、カラムによる分取精製を行った後に再結晶法により結晶を得るという方法により、原料中に見られるHPLCクロマトグラム上にピークを与える不純物の大部分を除去できることが確認された。ただし、カラム精製では、精製できる量に限界があり、数ｇ程度が現実的に確保できる量である。また、熱重量分析での測定から、乾燥を十分に行わない場合に、乾燥減量が３％程度みられ、溶媒あるいは水分によるものと推察された。これらも純度値に大きく影響するため、十分な乾燥が不可欠であることがわかった。

一方、一般的な精製法である再結晶法においても、カラム精製ほどではないものの、HPLC クロマトグラムにみられるピークのかなりの部分を除去できることが明らかになった。再結晶においては、数十グラムオーダーの精製品を得ることが可能であるため、供給候補品とすることが十分可能である。

以上より、値付けの基準とする高純度品としてはカラム精製品を、実際の供給候補品として生結晶品を用いることとし、以下の検討を行った。

３．精製コルチゾールの純度測定法の検討

（１）ステロイド系不純物についての定性分析

高純度コルチゾールに含まれるステロイド系不純物を定性するために、HPLC-UV による測定を行った。コルチゾールの主ピークの直前に一つのピークが確認された。また、主ピークの後ろにも比較的大きなピークが確認された(図 8)。この二つのピークに関して、以下の市販試薬を用いて保持時間を比較したが、同定には至らなかった。（使用した試薬：コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、酢酸コルチゾン、11,17,21-trihydroxy-5α-pregnane-3,20-dione (5α-dihydrocortisol）、11,17,21-trihydroxy-5β-pregnane-3,20-dione （5β-dihydrocortisol）、4-pregnene-11,17,20α,21-tetrole-3-one (20α-dihydrocortisol)、4-pregnene-11,17,20β,21-tetrole-3-one (20β-dihydrocortisol)、

5α-pregnane-17,21-diol-3,11,20-trione (5α-dihydrocortisone) 、
5β-pregnane-17,21-diol-3,11,20-trione (5β-dihydrocortisone) 、
4-pregnene-17,20α,21-triol-3,11-dione (20α-dihydrocortisone) 、
17,20β,21-trihydroxypregn-4-ene-3,11-dione (20β-dihydrocortisone))

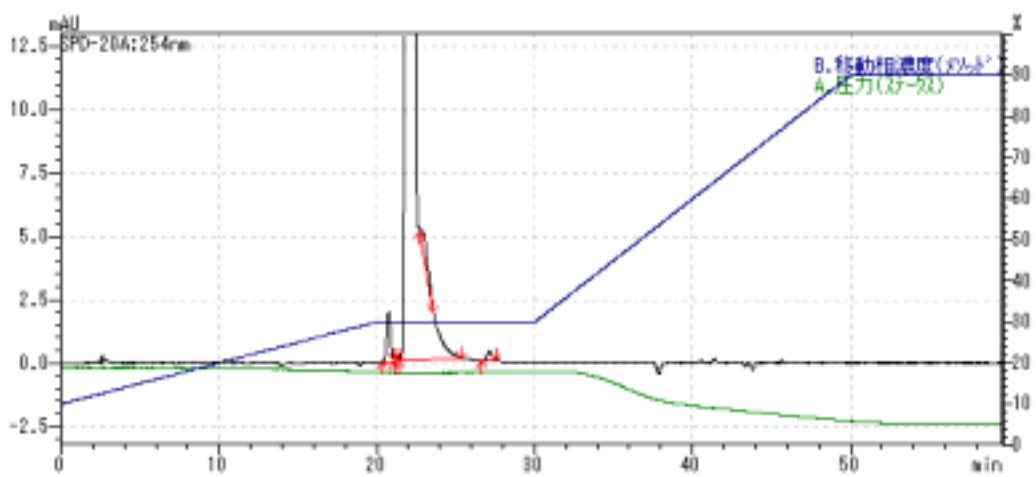


図 8　HPLC-UV による高純度コルチゾールのクロマトグラム

一方、LC-MS/MS を用いて精製コルチゾールを測定した結果、クロマトグラム上のコルチゾールの主ピーク中にコルチゾールの主イオンピークである *m/z* 363 のほかに、*m/z* 361 のピークが確認された。コルチゾンおよびプレドニゾロンの市販試薬を LC-MS/MS で測定した結果、*m/z* 361 の主イオンピークが確認され、また、保持時間がほぼ一致した。従って、これらのステロイドが不純物として含まれている可能性が高いことが示唆された。

（2）光イオン化プローブを用いた LC/MS によるステロイド化合物の分析

1）背景

質量分析法においては化合物によってイオン化の効率が異なるため、不純物を見落としなく検出するためにはいくつかのイオン化法を用いることが有効である。そこで、光イオン化プローブを用いた大気圧光イオン化法を用いて、コルチゾールおよびコルチゾールに含まれるステロイド系不純物の定性・定量分析のための検討を行った。

2）実験

質量分析計としてThermoelectron社製三連四重極型MS/MS装置TSQ Quantum Discovery Maxを用いた。LC部はAgilent社製 1100 システムを用い、イオン化法はエレクトロンスプレー（ESI）と大気圧光イオン化（APPI）の二種類を用いて両者を比較した。どちらの場合もポジティブモードで測定を行った。APPIでは低流量時に感度が著しく減少することが報告されているため、キャリアー溶媒としてメタノール（LC/MS用、和光純薬）とMilli-Qシステム（ミリポア）により

精製された水に酢酸（0.1 %w/w）を加えたものを用いた。

コルチゾール、およびコルチゾールに含まれることが予想される不純物の標品を用いて条件検討を行った。標品はそれぞれ濃度を約 10 ppm のメタノール溶液として調整し、装置に内蔵されているシリンジポンプにより 10 μL/min で送液、 50 %メタノール／0.1 %酢酸溶液（流速 0.2 mL/min）と混合して質量分析を行った。

3）結果

各物質についてインフュージョン測定により質量スペクトル測定を行った。APPI においては、エストラジオールを除いて全て$[M+H]^+$イオンが測定された。ESI においては、$[M+Na]^+$イオンも検出された。感度は全ての物質について ESI の方が約 10 倍高く、今回想定している化合物については ESI を用いた方が高感度であると考えられる。しかし APPI では Na イオンの付着が起きにくく、より単純で判別しやすい質量スペクトルが得られる可能性が高く、定性分析には有利であるため、ESI を補完する形で利用することが望ましいと考えられた。

LC/MS条件の検討では、コルチゾールに含まれることが予想される不純物の標品を用いた検討からは、ESI、APPIどちらを用いた場合でも、質量スペクトルもしくはクロマトグラム上で良好な分離が得られたが、APPIを用いた場合ではプレドニゾロンのピークが検出されなかった。また、エストロンと同じm/z値を持ち保持時間の異なるピークが検出された。

精製コルチゾールとNISTのコルチゾール標準物質（SRM 921）について、それぞれ 10 %(w/w) エタノール溶液についてLC/MSによる分析を行ったところ、ESIを用いることで候補物質からコルチゾンと思われるピークが、NIST SRM-921 からはコルチゾンの他に酢酸ヒドロキシコルチゾンと思われるピークが検出された。ESIでは主成分であるコルチゾールが溶出していると思われる時間帯で、イオンサプレッションに起因していると見られるベースラインの大きな乱れが見られた。しかし、APPIを用いた場合にはその様なベースラインの乱れは見られず、コルチゾール由来と思われるピークが測定に用いた各質量において検出された。それぞれの質量で、ピーク形状やピーク高さは少しずつ変化しており、今回用いた条件では精密な分離はできなかったものの、今後最適化を行うことでより詳細な分析が行える可能性が示唆された。

（3）精製コルチゾールの純度決定

コルチゾールは、熱に不安定であり、一次標準測定法である凝固点降下法を利用した純度の値付け方法は困難であると考えられた。そこで、不純物の差し引きにより純度を決定する差数法による純度の見積もりを検討した。精製コルチゾールに含まれている主要な不純物は、ステロイド系不純物、水分、残留溶媒と考えられた。ステロイド系不純物に関して、HPLC-UV を利用したところ、ピーク面積比で 0.4 %の不純物が確認された。一方、クロマトグラム上で主イオンピークと重なったコルチゾンおよびプレドニゾロンは、LC-MS/MS で測定することで、ピークを観察することができた。また、カールフィッシャーを用いた水分測定では、0.01-0.02 %の水分が検出された。また、ヘッドスペース(HS)-GC/MS および熱重量測定(TG)を用いて残留溶媒を測定した結果、0.09-0.1 %のエタノールが検出された。

HPLC-UV、LC-MS/MS、カールフィッシャー水分計、HS-GC/MS および熱重量測定を用いる

ことで、精製コルチゾールの純度が決定できることが明らかになった。今後、ステロイド系不純物に関して濃度測定法の詳細を決定することで、高純度コルチゾールの純度決定を行うことが可能である。

4. 同位体希釈質量分析法を用いた値付け方法の検討

（1）背景

少量の高純度標準物質を基準に同位体希釈質量分析法（IDMS）を用いた値付けによる標準物質供給実用化の可能性を検討するため、ガスクロマトグラフ質量分析法（GC/MS）および液体クロマトグラフ質量分析法（LC/MS）によるコルチゾール分析法についての検討を前年度に引き続き行った。

（2）ガスクロマトグラフ質量分析法

1）実験

ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC/MS)として Agilent 社製 6890 GC および 5973 MSD inert を用いた。カラムには、J&W 社製 DB-5ms (30 m × 0.25 mm、膜厚 0.25 µm)を使用した。イオン化には、電子衝撃イオン化(EI)法を採用した。

コルチゾール標準物質にアセトン(30 µl)およびヘプタフルオロ酪酸無水物(HFBA、 30 µl)を添加し、誘導体化(室温、4 時間)を行った。その後、窒素気流下で乾固させ、シクロヘキサン(20 µl)に再溶解させた。その検液(2 µl)を GC/MS に供した。

2）結果

コルチゾールは、熱に不安定のため、直接 GC/MS 測定することは、困難であった。そこで、誘導体化法を検討した。昨年は、メトキシム化した後、シリル化を行う MO-TMS 化を検討したが、良好な感度を得ることができなかった。本年は、HFBA による誘導体化法を検討した。HFBA は、無水条件化でコルチゾールに添加するだけで、誘導体化が可能であった。HFBA 誘導体化コルチゾールのマススペクトルを図 9 に示す。

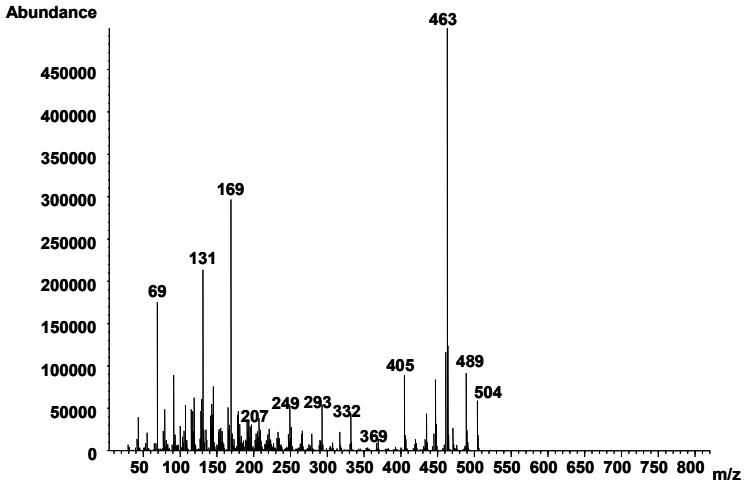


図 9　HFBA 誘導体化コルチゾールのマススペクトル

また、HFBA 誘導体化法の最適化を検討した結果、4 時間の反応時間で、HFBA 誘導体化コルチゾールの生成量が最大になった(図 10)。従って、誘導体化反応時間を 4 時間に設定した。

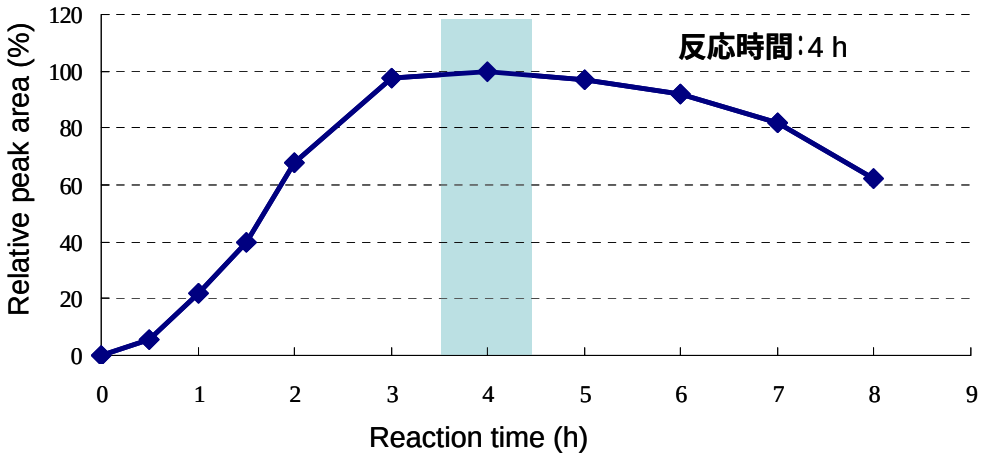


図 10　HFBA 誘導体化最適時間

本法の検出下限(S/N = 3)は、200 pg であり、高感度な測定が可能であった。また、安定同位体標識化合物として、コルチゾール-d_2 を用いた。

コルチゾール標準物質にコルチゾール-d_2 を添加し、HFBA 誘導体化した後、ID-GC/MS を用いて、測定した結果、コルチゾール／コルチゾール-d_2 の質量比 0.8～1.2 の間で相関係数 0.99 以上と十分な直線性が得られた。

本法を用いることで、純度を決定した少量の高純度物質を用いた再結晶精製品の高精度な値付けが可能であり、コルチゾール標準物質開発の実現において有用であると考えられた。

（3）液体クロマトグラフ質量分析法

1）実験

質量分析計としてThermoelectron社製三連四重極型MS/MS装置TSQ Quantum Discovery Maxを用いた。LC部はAgilent社製 1100 システムを用い、インターフェースにはエレクトロンスプレー(ESI)を用い、ポジティブモードで測定を行った。カラムには内径 2.0 mmのCadenza C-18（Imtakt）を用いた。移動相溶媒にはメタノール（LC/MS用、和光純薬）とMilli-Qシステム（ミリポア）により精製された水に酢酸（0.1%w/w）を加えたものを用いた。

2）結果

今年度はグラジエント法によるLC-MS/MSについて検討を行った。最適化したグラジエント条件においてコルチゾールに含まれることが予想される不純物の標品を用いてSIMモードによる測定を行ったところ、他の不純物とクロマトグラム、および質量スペクトル上で良好な分離が得られた。IDMSを用いた場合の条件についても検討し、アイソクラティックモードを用いた場合と同等以上の精度で分析できることを確かめた。

本法は昨年度検討したアイソクラティックモードによるLC-MS/MSより長い分析時間が必要となるが、比較的親水性の高い不純物の影響をより低く抑えることが可能になるため、状況に応じ使い分けることが望ましいと考えられる。

５．まとめ

高純度品および不純物の比較的少ない供給候補品が得られ、また、高純度品の不純物定量を含めて、値付けに必要な分析法もほぼ確立できた。今後は実際の供給を目指して準備を進める計画である。

２-３-６　今後の課題

C 反応性蛋白については、標準液としての供給が可能になった。今後は、国際的なデータベースへの登録を行うとともに、この標準物質に基づいた実試料系（血清）標準物質の開発を可能とし、実際のユーザーが使う標準物質のトレーサビリティソースとなるように努めていきたい。

アルブミンに関しては、純度の高い原料が入手できれば、値付けが実施可能であることが明らかになった。今後原料入手に関して検討を行っていく必要がある。

コルチゾールに関しては、供給候補品の調製および、値付けに必要な高純度品の調製および値付け技術の確立を行うことができたため、今後、実際の標準物質供給へ向けて準備を進めたい。

参考文献

１）田中　俊夫, 松尾　雄志, 医学書院 46, 973 (2002).
２）E. B. Oliveira, E. C. Gotschlich, T. Y. Liu, Proc Natl Acad Sci U S A 74, 3148 (1977).

泉　美治, 中川　八

2-4　実試料系標準物質の調査研究

2-4-1　総　括

1．調査研究の進め方

平成17年度および18年度に検討した項目の中で、継続検討および文献調査群により標準物質候補品が作製可能な項目を表１のごとく選び、項目群ワーキンググループ(WG)を設けて活動した。

表１　項目群ワーキンググループ一覧表

WG 名	項　　目
C3	血清抗核抗体(ANA)、RF
C5	黄体形成ホルモン(LH)､卵胞刺激ホルモン(FSH)、エストラジオール(E2)
C6	フリーT4(FT4)
C8	FDP、D ダイマー
C9	β２-マイクログロブリン

平成17年度および18年度と同様に、実効計画書を作成して、検証実験を行った。

＊実行計画書の考え方＊

①各項目を基準１・基準２で調査し分類する。
　基準１：公的標準物質（NIST・WHOなど）の調査
　基準２：純物質・精製物質の入手の可・否の調査

⇩

［標準物質候補品が作製可能な場合］

⇩

②標準物質候補品を作製
③標準物質候補品の評価
　実試料（患者血清・患者尿　など）を用い反応性の確認を行う。

2．結果

調査により標準物質候補品の検討継続および作製可能と判断した項目は、RF・抗核抗体・E2・FSH・LH・FT４・FDP・D ダイマーおよびβ２マイクログロブリンである。これらについて標準物質候補品を作製し､、検証実験を行い、以下のごとくの結果を得た。

1）RF：健常者試料を収集することでカットオフ値を設定することができた。これにより健常者試料の特性条件を作成することができた。また、カットオフ根の維持のためのパネル血清の特性条件を作成することができた。

2）抗核抗体：患者検体・健常検査体において HEPASERA-1 による補正で力価や陽性率において試薬間差が小さくなった。今後、標準品の作製場所・使用方法・染色型判別法ガイドラインなどの標準測定法の検討が必要である。
3）E2：平成 18 年度において用いた試料について、ID-LC/MS 法で値付けした結果、ヒトプール血清（抗原未添加）による収束性が確認できた。
4）LH、FSH：WHO 標準物質添加標準品を上位標準品とし、マトリックスの影響が少ない複数の市販キットで、ヒトプール血清（抗原未添加）に値付けした標準物質が有効であると判断した。
5）FT4：ヒトプール血清（抗原未添加）で収束性が確認できた。
6）FDP、Dダイマー：低分子フィブリン分解物を添加しない高分子フィブリン分解産物の標準品で、収束性が確認できた。
7）β 2-マイクログロブリン：リコンビナント抗原系標準物質に比し、天然抗原（血清ベース）で収束性が確認できた。ERM-DA470 は、リコンビナント抗原が添加されていることから、本標品での各社のキットの反応性について検討課題である。

3．今後の課題

平成17年度および18年度で標準物質が作成可能と判断した項目について、実験計画書および標準物質候補品を作製し、検証実験を行った。このうちE2、LH、FSH、FT4、β 2-マイクログロブリンについては、プール血清（抗原未添加）が有効という結果となった。しかし、プｒ-ル血清の作製にあたり、血清の選択条件、性状、保存方法など今後解決する必要がある加課題が多くある。

標準物質候補品の反応性評価試験に必要な実試料（健常人血清・患者血清など）の入手は、従来通り時間を要した。今後、プール血清を作製するに当たっても、入手先の倫理委員会の許可が必要となれば、迅速な作製・検討などが困難になるため、別途、実試料の入手方法の設定が必要である。

2-4-2 各 論

2-4-2-1 血清抗核抗体 (ANA)

要旨

1）抗核抗体検査は、膠原病或いは自己免疫疾患のスクリーニング検査或いはモニタリング検査として行われており、現在ではヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法が標準的な方法となっている。しかし、蛍光抗体法の判定は使用する蛍光顕微鏡の検出感度の影響を受けること、術者の個人差の影響を受けることから、測定結果にばらつきが生じている。また、抗核抗体検査の陽陰性の判定基準（カットオフ値）は、施設間で統一されていないことから、診療に混乱を招いている。

2）平成 17 年度の本調査研究により、特定の測定値（抗体力価）を持った患者血清を標準品として測定を行うことにより、施設間、術者間、装置間の差を改善できることが予想された[1)]。平成 18 年度の本調査研究により、現在市販されている試薬間での標準品使用の効果が少数検体（染色型別、力価別の 8 検体）で確認された[2)]。また、研究で用いた標準品と WHO 標準品（66/233）[3)] との関係も確認された。

3）しかし、日常検査においては、多様な検体と遭遇することから、本年度は日常的に遭遇する自己免疫疾患患者検体と健常者検体を用いて、市販試薬間の差の確認と標準品を用いる効果を確認した。

4）その結果、日常検体においても標準品を用いることにより、測定間の差を有意に改善できることが確認された。また、健常者における陽性率の差も改善できることが確認された。

5）国内標準物質候補品の性状の確認を行い、作製プロトコル案を提案した。

1．目的

本調査研究項目群、C3（抗核抗体、RF）の抗核抗体について、日常検体における各社の試薬の測定値が標準品を使用することで近似することの確認を本調査研究の目的とした。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	新井次郎	株式会社医学生物学研究所
運営管理者（臨薬協）	山本 茂一	株式会社カイノス
柱 1／C3 担当	嶋本 三利	株式会社三菱化学ヤトロン
技術アドバイザー	熊谷 俊一	神戸大学大学院　教授
技術アドバイザー	小柴 賢洋	兵庫医科大学　教授
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　准教授
技術アドバイザー	森下 芳孝	名古屋大学医学部附属病院　技師長

	氏名	所属
技術担当者	松内 和洋	株式会社エイアンドティー
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	倉持 啓一	株式会社テイエフビー
技術担当者	大塚 一郎	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	日向　隆	株式会社カイノス
技術担当者	北村 竜太郎	極東製薬工業株式会社
技術担当者	船越 國宏	シスメックス株式会社
技術担当者	根占 哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	鎌田 祥子	デンカ生研株式会社
技術担当者	高橋 義孝	日水製薬株式会社
技術担当者	松坂 啓之	日東紡
技術担当者	波多野 裕通	株式会社日本凍結乾燥研究所
技術担当者	藤居　賢	日本ﾊﾞｲｵﾗｯﾄﾞﾗﾎﾞﾗﾄﾘｰｽﾞ株式会社
技術担当者	伊東 理絵	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	野村 昭夫	株式会社三菱化学ヤトロン

３．委員会の開催

⑯ 第一回会合：2005/11/07（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑰ 第二回会合：2005/12/07（水）11：00～13：00　（臨薬協会議室）
⑱ 第三回会合：2006/01/17（火）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑲ 第四回会合：2006/03/10（金）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑳ 第五回会合：2006/04/18（火）13：00～14：14　（臨薬協会議室）
21 第六回会合：2006/08/02（水）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
22 第七回会合：2006/09/26（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
23 第八回会合：2006/12/22（金）15：00～17：00　（三菱化学ヤトロン会議室）
24 第九回会合：2007/04/25（水）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
25 第十回会合：2007/06/12（水）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
26 第十一回会合：2007/08/28（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
27 第十二回会合：2007/11/27（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
28 第十三回会合：2008/01/15（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１測定値互換性の現状

調査研究に参加した企業にアンケート調査を行った結果、間接蛍光抗体法を用いた抗核抗体

の測定試薬を販売している参加メーカー数は 5 社、試薬数は 5 試薬であった。

過去の抗核抗体標準化に関する対応の記録を委員会で調査・確認した結果以下のとおりであった。

① 抗核抗体精度管理（(株）医学生物学研究所）の結果から、HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法による抗核抗体検出試薬において、校正物質使用の効果が確認されている[4]。

② その後、平成 17 年に　厚生労働科学研究補助金　医療技術評価総合研究事業　自己抗体の効率的利用法に関する研究「リウマチ因子、抗核抗体の標準化に関する全国アンケート調査およびサーベイ結果報告」[5] として報告されている。

いずれの報告も間接蛍光抗体法による抗核抗体検査において、校正物質の使用による施設間差の改善効果が確認されていた。しかし、試薬間差については評価がされていなかった。

平成 18 年度の本研究により、市販 5 試薬の差について少数検体で確認され[2]、試薬間差は小さいことが予想された。

4－2 標準化および標準物質の設定経過

抗核抗体の国際標準品として WHO 標準品（66/233）があるが、現在、これに準拠している試薬は無い。また、WHO 標準品の値は IU/ml で表示されているが、日常的に用いられている血清希釈倍数による力価表示との科学的関連性が無いこと、値付けがラット肝切片で行われているが、現在では HEp-2 細胞を基質とした方法に切り替わっていることから、これを上位標準品とすることはせず、既に国内で抗核抗体の標準品として販売されており、血清を性状とした HEPASERA-1（(株）医学生物学研究所）を国内標準物質の候補として設定した。

なお、WHO 標準品と HEPASERA-1 の関係は平成 18 年度の本研究により確認した[2]。

4－3 値付けの測定方法の選択

現在市販されている抗核抗体を検出する試薬には、ELISA 法、ラテックス凝集法なども含まれるが、使用している抗原が異なるため、検出できる自己抗体も異なる。

本研究では現在、最も広く抗核抗体測定試薬として使用されているヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法を標準化の対象試薬とした。

従って、値付けの方法もヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法を用いることとした。

5．標準物質の設定概要

5－1 実験計画書

5－1－1 試薬間差の確認実験

- 自己免疫疾患患者血清および健常者血清を対象試薬販売 5 社に配布し、各社試薬で測定する。
- 国内標準物質候補品を同時に配布、測定する。

・ 各試薬での測定結果を一致率（最頻値±１管を一致とする）で評価、国内標準物質候補品による補正後の一致率と比較し、校正による効果を確認する。

5－1－2 国内標準物質候補品の性状の確認

・ HEPASERA-1 に含まれる自己抗体を ELISA 法で確認する。
・ 確認項目は、抗 U1-RNP 抗体、抗 Sm 抗体、抗 SS-A 抗体、抗 SS-B 抗体、抗 Scl-70 抗体、抗 Jo-1 抗体、抗 CENP-B 抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 ssDNA 抗体とする。
・ 分析は（株）医学生物学研究所にて行う。

5－2 共同実験

試薬間差の確認について共同実験を実施した。

5－2－1 測定試料

自己抗体陽性患者血清 50 例：神戸大学大学院教授　熊谷俊一先生に提供頂いた。
また、判定の再現性を確認する目的でブラインドにて同一検体を 4 例挿入した。
健常者血清 100 例：神戸大学医学部付属病院の職員および（株）医学生物学研究所　社員から同意を得てボランティア採血した。
健常者ボランティア血清の収集は、リウマトイド因子（RF）標準化の共同実験と同時に実施し、一部を本共同実験に用いた。（詳細は RF 標準化報告を参照）
上記、患者および健常者血清は、100μL ずつ分注し冷蔵にて送付し、検査まで冷蔵保存した。
なお、検体送付から検査までの期間は 2 週間以内とした。
また、HEPASERA-1 を同時に配布、測定した。

5－2－2 測定方法

・ 各試薬の添付文書に従って、配布試料を測定した。
・ 測定は、各社が自社の試薬にて実施した。
・ HEPASERA-1 は精製水 100μL にて溶解し、溶解時の添加精製水の重量を記録した。
・ 被検血清、HEPASERA-1 は、20 倍希釈を初希釈として倍々希釈して測定した
・ 健常者血清は、20 倍希釈にてスクリーニングし、陽性検体のみ定量値を求めた。
・ HEPASERA-1 は、3 回希釈測定し、それぞれの測定値を報告した。
・ 各試料の定量値は、各社の判定基準に従って判定し、最終力価を報告した。
・ 蛍光顕微鏡は、以下の顕微鏡、条件で判定した。
  オリンパス BX シリーズ：WIB（U-MWIB、U-MWIB2、U-MWIBA2）、ND25 使用、または、ニコン OPTIPHOT-2：WIB（U-MWIB）
・ 各測定結果は、下記のように比較し、HEPASERA-1 使用による効果を評価した。
  ＜患者血清の染色型＞
  判定の一致性を以下の 3 通りで評価した。

評価①：5 試薬の判定が完全に一致するもの

評価②：Ho+Sp=Ho or Sp、Ho=Pe は一致として処理

評価③：3 試薬が一致するもの

＜患者血清の定量値＞

参加 5 試薬の最頻値±1 管以内を一致として、患者検体 50 例における一致率が HEPASERA-1 使用で改善したか、統計的な有意差を検定した。

＜健常者の陽性率＞

カットオフを変化させて各試薬の陽性率を算出した。また、試薬間の陽性率が HEPASERA-1 補正により近似するか確認した。

- HEPASERA-1 による測定値の補正は、以下の方法に従った。

  補正係数＝HEPASERA-1 表示値／実測値

  各検体の補正値＝検体の実測値×補正係数

- 患者血清および健常者血清の定量値の HEPASERA-1 による補正は、染色型別に実施した。染色型が混在している検体については、最終力価が高い染色型で補正した。

5－2－3 測定結果

1）使用顕微鏡（表１）

使用顕微鏡を示す。5 社の顕微鏡条件は概ね一致していた。

表1 使用顕微鏡

メーカー	A社	B社	C社	D社	E社
試薬	R1	R2	R3	R4	R5
顕微鏡名称	オリンパス BX61	オリンパス BX50	ニコン OPTIPHOT-2	オリンパス BX51	オリンパス BX51
キューブ（フィルタブロック）	U-MWIB3	U-MINIB	B-3A	U-MWIBA2	U-MWIB2
励起フィルター	BP460-495	BP470-490	EX420-490	BP460-490	BP460-490
ダイクロイックミラー	DM505	DM505	DM510	DM505	DM505
吸収フィルター	BA510IF	BA510IF	BA520	BA510IF	BA510IF
NDフィルター等	ND25	ND25	なし	ND25	ND25

2）HEPASERA-1 の測定結果と補正係数（表２－１～表２－３）

各社で HEPASERA-1 を 3 回測定し、その平均値を集計後、各試薬の補正係数を計算した。なお、各社の HEPASERA-1 の溶解量は、報告された溶解時の精製水重量により、妥当であると考えられた。

表2－1　HEPASERA-1平均測定値 (n=3)　　（力価）

	表示値	R1	R2	R3	R4	R5
Ho	320	320	320	320	640	160
Sp	320	320	640	1280	640	320
Nu	320	320	320	640	1280	160
Dis-sp	320	640	640	320	1280	160

表2－1　HEPASERA-1補正係数

	表示値	R1	R2	R3	R4	R5
Ho	320	1	1	1	1/2	2
Sp	320	1	1/2	1/4	1/2	1
Nu	320	1	1	1/2	1/4	2
Dis-sp	320	1/2	1/2	1	1/4	2

表2－3　HEPASERA-1の溶解時精製水重量　　(mg)

	A社	B社	C社	D社	E社
Ho	100.0	103.0	99.8	100.0	97.0
Sp	101.0	102.0	100.0	100.6	100.0
Nu	100.0	103.0	99.9	100.4	94.0
Dis-sp	100.0	103.0	100.1	100.3	97.0

3）患者血清の測定結果

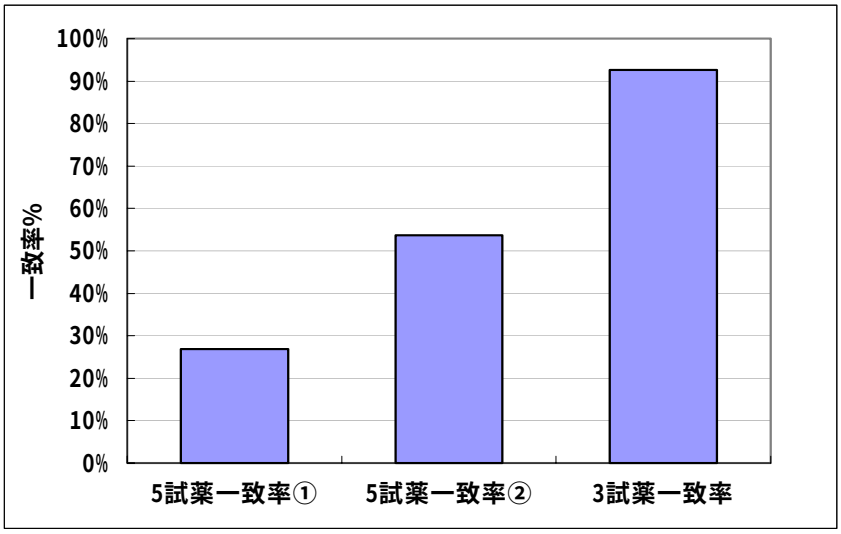
各試薬の判定結果を表３に示した。

3）-１染色型の一致率（図１）

染色型の一致は、5 試薬の報告が完全に一致した場合（5 試薬一致率①)、主要な染色型が一致している場合（5 試薬一致率②)、3 試薬以上が主要な染色型で一致した場合（3 試薬一致率）で比較した。

3 試薬一致率は 90%以上と良好だった。主要な染色型において大きく異なる報告がされたのは１例（No.ANA-11）のみであった。この検体の個別自己抗体を ELISA 法にて確認したところ、抗 SS-A 抗体のみが陽性となり、染色型としては Speckled 型（Sp）を含む報告が妥当と考えられた。

図1　患者検体における染色型の一致率
検体数;50例
陰陽性不一致検体除外;9例 (陰陽性不一致例)
有効数;41例



5試薬一致率①	5試薬一致率②	3試薬一致率
11/41	22/41	38/41
26.8%	53.7%	92.7%

5試薬一致率①;完全一致
5試薬一致率②;HoとSp、HoとPeは一致として処理
3試薬一致率　;HoとSp、HoとPeは一致として処理

3）-2 定量値の一致率と　HEPASERA-1 による補正効果

患者血清の定量値（力価）分布を表４に示した。また、試薬 R4 と最頻値の力価分布を図２に示した。5 試薬の報告値の最頻値或いは中央値（以下、最頻値）との比較を報告値（以下、未補正)、各患者血清を染色型別補正係数を用いて補正値（以下、HEPASERA-１補正)、HEPASERA-1 の Ho の補正係数で全患者血清を補正した値（以下、Ho 補正）で行った。

最頻値に対する各試薬の力価の有意差を t 検定にて確認したところ、未補正において試薬 R4、R5 において、有意（$p<0.05$）となった。

これに対し、HEPASERA-1 補正後、Ho 補正後ではいずれも 5 試薬とも最頻値との有意差は無かった。また、力価の平均値を比較すると未補正時より補正後の試薬間の平均力価のばらつきが小さかった。

一方、最頻値に対する各試薬の一致率を未補正、補正後で比較（X^2 検定）すると、補正後の一致率が有意に高くなった。(図３)

以上の結果から、HEPASERA-1 を用いた補正が試薬間差を是正できることが、患者血清においても確認された。また、染色型別に補正する必要性については、一致率においては Ho 補正と HEPASERA-1 補正に明確な差は出なかったものの、力価の平均値の最頻値との差は、HEPASERA-1 補正が最も小さいことから、染色型別の補正が測定間差をより小さくすることが示唆された。

表4　患者検体の力価分布

未補正

データ区間	最頻値	R1	R2	R3	R4	R5	
0	1	3	1	1	2	**8**	
20	2	2	1	0	0	3	
40	5	5	**10**	4	0	7	
80	**7**	6	6	**8**	3	**7**	
160	**11**	**10**	**9**	**11**	6	**11**	
320	**7**	**7**	**8**	**6**	6	4	
640	5	**7**	2	6	**11**	5	
1280	6	5	7	6	**9**	0	
2560	4	4	4	5	**8**	3	
次の級	2	1	2	3	5	2	R
平均力価	1030	718	1020	1293	1765	501	**1264**
最頻値平均値との差		-312	-11	262	734	-529	
P値 (t検定：対最頻値)		0.1460	0.8100	0.1210	**0.0019**	**0.0958**	

HEPASERA-1補正後

データ区間	最頻値	R1	R2	R3	R4	R5	
0	1	1	1	1	2	**8**	
20	0	2	2	0	2	0	
40	**8**	7	**10**	**9**	2	3	
80	**10**	**7**	**9**	**8**	6	**10**	
160	**9**	**9**	6	**12**	**9**	6	
320	6	**9**	7	6	**9**	**10**	
640	6	6	4	4	8	4	
1280	7	6	**9**	6	**9**	4	
2560	2	1	1	2	1	2	
次の級	1	2	1	2	2	3	R
平均力価	653	693	830	660	687	767	**169**
最頻値平均値との差		40	177	8	34	114	
P値 (t検定：対最頻値)		0.4859	0.4133	0.8930	0.8009	0.3259	

Ho補正後

データ区間	最頻値	R1	R2	R3	R4	R5	
0	1	3	1	1	2	**8**	
20	0	2	1	0	0	0	
40	7	5	**10**	4	3	3	
80	**8**	6	6	**8**	6	7	
160	**7**	**10**	**9**	**11**	6	**7**	
320	**9**	**7**	**8**	**6**	**11**	**11**	
640	6	**7**	2	6	**9**	4	
1280	8	5	7	6	**8**	5	
2560	1	4	4	5	3	0	
次の級	3	1	2	3	2	5	R
平均力価	841	718	1020	1293	882	1002	**574**
最頻値平均値との差		-122	179	452	42	162	
P値 (t検定：対最頻値)		0.1245	0.4153	0.0555	0.7777	0.2638	

図2 患者検体の定量値分布 ＝最頻値とR4の比較＝

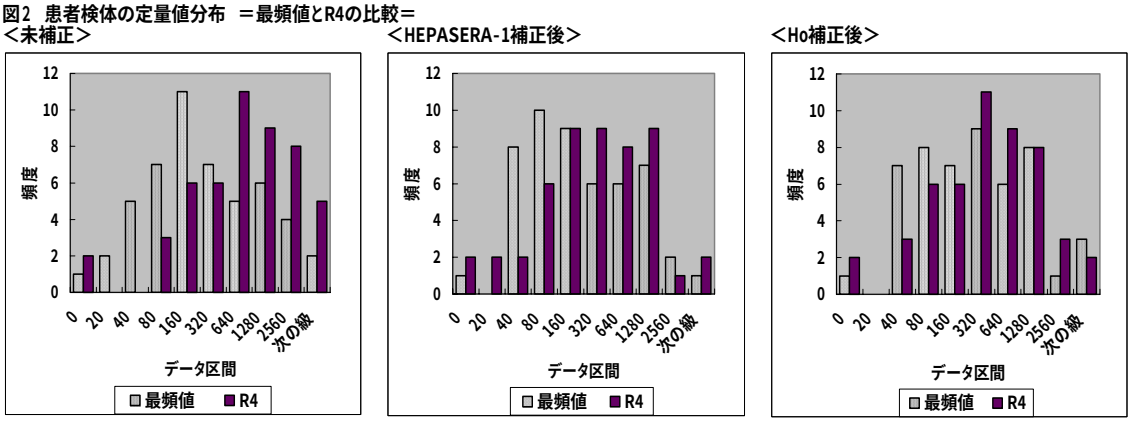
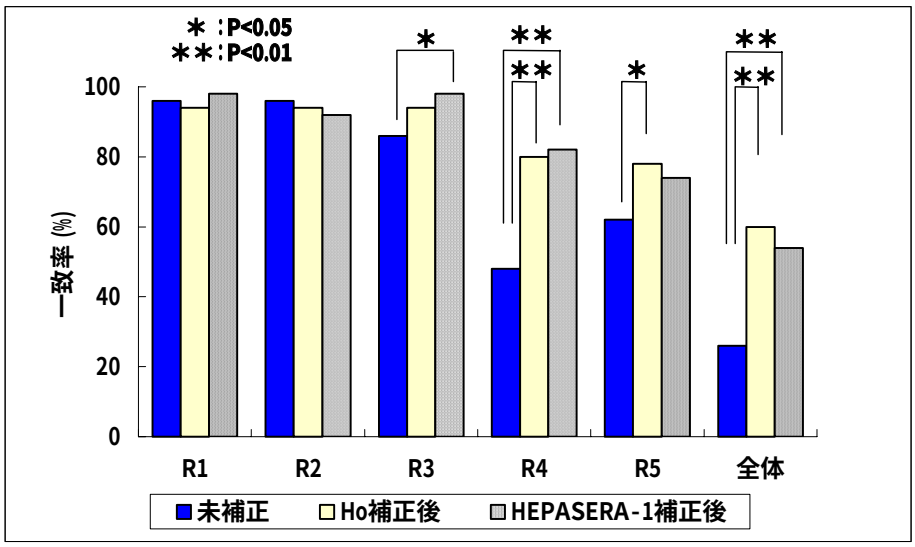


図3 患者血清におけるHEPASERA-1補正前後の定量値の一致率



力価の一致率 (%)

	R1	R2	R3	R4	R5	全体
未補正	96	96	86	48	62	26
Ho補正後	94	94	94	80	78	60
HEPASERA-1補正後	98	92	98	82	74	54

4）健常者血清の測定結果

4）-1 健常者血清の背景

使用した健常者血清のアンケート調査結果を表5に示した。

自己免疫疾患の罹患率が十分低いことから、棄却基準は設けずに 100 例全てを解析に用いた。

2 親等以内に膠原病或いは関節リウマチ患者がいる例が 10 例あったが、抗核抗体の結果との関係は検討していない。

表5 健常者血清の背景

No.	年齢	性	喫煙習慣	既往歴	家族歴(2親等以内)
	年代	M = 男性 F = 女性	有・無	RA・膠原病・特になし	RA・膠原病・特になし
N-1	20	F	無	無	無
N-2	20	M	15本/日	無	無
N-3	30	M	無	無	無
N-4	30	M	10本/日	無	無
N-5	30	F	無	無	無
N-6	30	M	無	無	無
N-7	20	M	無	無	無
N-8	20	F	無	無	無
N-9	20	M	有	無	無
N-10	20	F	無	無	無
N-11	30	M	有	無	無
N-12	30	M	無	無	無
N-13	40	M	無	無	無
N-14	30	F	無	無	無
N-15	30	M	無	無	無
N-16	40	M	無	無	無
N-17	20	F	無	無	無
N-18	20	F	無	無	無
N-19	20	F	無	無	無
N-20	50	M	無	無	無
N-21	30	M	無	無	無
N-22	40	M	無	無	SjS疑い
N-23	20	F	有	無	無
N-24	20	F	無	無	RA
N-25	20	M	無	無	無
N-26	30	F	無	無	無
N-27	30	F	無	無	RA
N-28	40	M	無	無	RA
N-29	40	M	無	無	無
N-30	20	F	無	無	無
N-31	20	F	無	無	無
N-32	50	M	無	無	無
N-33	30	M	無	無	無
N-34	50	M	無	無	無
N-35	40	F	無	無	無
N-36	30	F	無	無	無
N-37	40	F	無	無	無
N-38	30	F	無	無	無
N-39	20	F	20本/日	無	無
N-40	30	F	無	無	RA 2名
N-41	40	F	無	無	無
N-42	20	M	無	無	無
N-43	20	M	無	無	無
N-44	20	F	無	無	RA
N-45	20	F	無	無	無
N-46	20	F	無	無	無
N-47	20	F	無	無	無
N-48	30	F	無	無	無
N-49	20	F	無	無	無
N-50	20	F	無	無	膠原病

No.	年齢	性	喫煙習慣	既往歴	家族歴(2親等以内)
	年代	M = 男性 F = 女性	有・無	RA・膠原病・特になし	RA・膠原病・特になし
N-51	20	F	無	無	無
N-52	20	F	無	無	無
N-53	20	F	無	無	無
N-54	20	F	無	無	無
N-55	20	F	無	無	無
N-56	20	F	無	無	無
N-57	20	F	無	無	無
N-58	20	F	無	無	無
N-59	20	F	0.5年前	無	RA
N-60	20	F	無	無	無
N-61	20	F	無	無	無
N-62	20	F	無	無	無
N-63	30	F	無	無	無
N-64	50	M	15年前	無	無
N-65	20	F	無	無	無
N-66	20	F	無	無	無
N-67	30	F	無	無	無
N-68	40	M	無	無	無
N-69	20	M	28年前	無	無
N-70	20	M	23年前	無	無
N-71	20	F	無	無	無
N-72	30	F	無	無	無
N-73	30	M	無	無	無
N-74	40	F	無	無	無
N-75	30	F	無	無	無
N-76	20	M	有	無	無
N-77	60	M	10年前	無	無
N-78	20	F	無	無	無
N-79	20	F	無	無	無
N-80	20	M	無	無	無
N-81	20	M	無	無	RA
N-82	20	F	無	無	無
N-83	20	F	無	無	無
N-84	20	F	無	無	無
N-85	20	F	無	無	RA
N-86	20	F	無	無	無
N-87	20	F	無	無	無
N-88	20	F	無	無	無
N-89	20	M	無	無	無
N-90	20	M	無	無	無
N-91	20	F	無	無	無
N-92	20	F	無	無	無
N-93	50	F	有	無	無
N-94	20	F	無	無	無
N-95	50	M	無	無	無
N-96	30	M	無	無	無
N-97	20	F	無	無	無
N-98	20	F	無	無	無
N-99	20	F	無	無	無
N-100	30	F	無	無	無

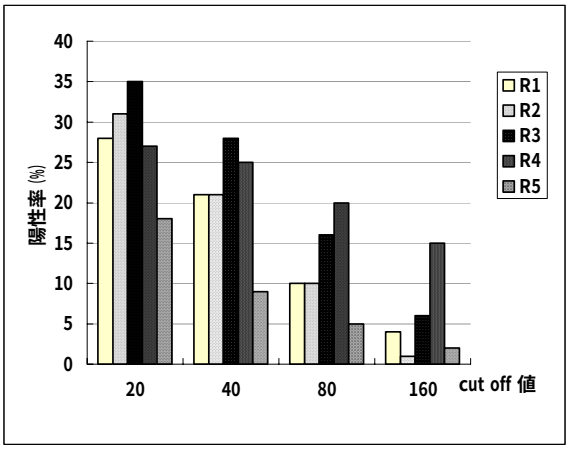
4）-2 健常者の陽性率と HEPASERA-1 による補正効果

カットオフを 20 倍から 160 倍まで変化させ、未補正と HEPASERA-1 補正における陽性率を比較した（図４）。HEPASERA-1 補正を行うことにより試薬間における陽性率の差は改善しており、標準物質を使用することが標準化に寄与することが確認された。

一方、現在最も一般的に使用されているカットオフ値 40 倍における陽性率は約 20%となった。今後、感度、特異度の観点から、カットオフ値の見直しが課題である。

図4　カットオフ値による健常者陽性率の変化（未補正）

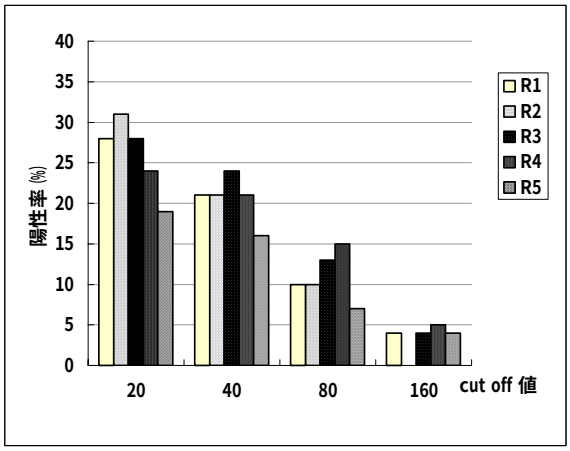
未補正の陽性率



(%)

カットオフ	R1	R2	R3	R4	R5	R
20	28	31	35	27	18	17
40	21	21	28	25	9	19
80	10	10	16	20	5	15
160	4	1	6	15	2	14

HEPASERA-1補正後の陽性率



(%)

カットオフ	R1	R2	R3	R4	R5	R
20	28	31	28	24	19	12
40	21	21	24	21	16	8
80	10	10	13	15	7	8
160	4	0	4	5	4	5

5）測定の再現性

同一検体 4 例の各試薬の判定結果を表 6 に示した。

力価、染色型とも差がある判定が散見される。

測定間の誤差要因としては、検体の希釈誤差、顕微鏡など測定環境に起因するものが挙げられるが、術者の熟練度も無視できない要因である。

標準化を維持するための方法の策定が課題である。

表6　同一検体の再現性

No.	R1		R2		R3		R4		R5	
	力価	染色型	力価	染色型	力価	染色型	力価	染色型	力価	染色型
ANA-5	160	Ho+Sp	**320**	Sp	**160**	Ho+Sp	640	Ho+Sp	**160**	**Ho+Sp**
ANA-43	160	Ho+Sp	**160**	Sp	**320**	Ho+Sp	640	Ho+Sp	**80**	**Sp**
ANA-9	160	Ho	160	Ho	160	**Ho**	**320**	Ho	**160**	Ho
ANA-44	160	Ho	160	Ho	160	**Ho+Nu**	**640**	Ho	**80**	Ho
ANA-19	640	Nu	1280	Nu	**640**	**Nu**	5120	**Nu+Sp**	**80**	Nu
ANA-45	640	Nu	1280	Nu	**2560**	**Nu+Sp**	5120	**Nu**	**40**	Nu
ANA-40	40	Ho+Sp	40	Ho	40	Ho	160	Ho	**0**	-
ANA-46	40	Ho+Sp	40	Ho	40	Ho	160	Ho	**20**	Ho

6）HEPASERA-1 の性状

HEPASERA-1 の性状は以下の通りである。また、今回使用した HEPASERA-1　Lot.070C の個別自己抗体の分析結果を表 7 に示した。

性状（染色型共通）；

希釈調整ヒト血清（凍結乾燥品）

希釈液：BSA 加　PBS　pH7.2（0.09%アジ化ナトリウム含）

その他：HBs 抗原、HIV 抗体、HCV 抗体　陰性

表7　HEPASERA-1　分析結果

測定値

	MESACUP-2 RNP	MESACUP-2 Sm	MESACUP-2 SS-A	MESACUP-2 SS-B	MESACUP-2 Scl-70	MESACUP-2 CENP-B	MESACUP-2 Jo-1	MESACUP-2 M2	MESACUP-2 dsDNA	MESACUP-2 ssDNA
Lot	040	026	037	040	024	030	030	023	683	560A
製品有効	2007_08	2007_08	2007_09	2008_05	2007_07	2007_06	2007_06	2007_09	2007_02	2007_08
陰性域	＜15	＜7	＜10	＜15	＜16	＜10	＜9	＜7	≦12	≦25
陽性域	22≦	30≦	30≦	25≦	24≦	16≦	18≦			
Ho	2.6	1.0	7.7	2.2	3.6	2.3	1.5	3.9	**28.3**	**103.3**
Sp	**197.4**	**21.8**	0.0	4.7	4.6	0.2	1.9	2.6	8.8	9.8
Nu	3.4	0.5	1.8	2.1	2.9	7.7	1.4	0.5	4.9	**111.3**
Dis-sp	3.5	0.4	2.9	5.2	4.7	**157.4**	0.4	0.6	14.6	**26.6**

定性判定

	RNP	Sm	SS-A	SS-B	Scl-70	CENP-B	Jo-1	M2	ds	ss
Ho	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	**(+)**	**(+)**
Sp	**(+)**	**(±)**	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)
Nu	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	**(+)**
Dis-sp	(−)	(−)	(−)	(−)	(−)	**(+)**	(−)	(−)	(−)	**(+)**

6．標準物質の作製プロトコル

6‐1 トレーサビリティ連鎖

ヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法による抗核抗体検査には標準物質が存在しないため、今回検討した国内標準物質候補品 HEPASERA-1 を製造業者自社推奨校正用基準物質とし、これを維持することでトレーサビリティを確保できると考えられる。

操作法は、今回検討した 5 試薬間では標準物質を用いることで差を解消できることから、ヒト喉頭癌由来細胞株 HEp-2 細胞を基質とした間接蛍光抗体法を製造業者自社推奨標準操作法とした。

6‐2 試料の性状規格

国内標準物質の性状（案）

性状（染色型共通）；

希釈調整ヒト血清（凍結乾燥品）

希釈液：BSA 加　PBS　pH7.2（0.09%アジ化ナトリウム含）

その他：HBs 抗原、HIV 抗体、HCV 抗体　陰性

性状(染色型別)；

	染色型の規格 :単独の染色型を示すこと	力価の規格	含まれていることが望ましい抗体
Homogeneous	明瞭なHomogeneous型を示す	80-640倍	抗dsDNA抗体 陽性
Speckled	明瞭なSpeckled型を示す	80-640倍	抗U1-RNP抗体 陽性
Nucleolar	明瞭なNucleolar型を示す	80-640倍	抗体は規定しない
Centromere	明瞭なCentromere型を示す	80-640倍	抗Centromere抗体 陽性

＊染色型および力価の確認は、ヒト喉頭癌由来細胞株HEp-2細胞を基質とした間接蛍光抗体法にて行う。

当初は、各染色型に代表的な自己抗体を含むことを性状とする予定であったが、昨今のヒト血清入手の困難性を鑑み、明瞭な染色型を示すことと力価のみを規格とした。

6－3 値付けの方法

1）蛍光顕微鏡

オリンパス BX シリーズ：WIB（U-MWIB、U-MWIB2、U-MWIBA2)、ND25 使用、または、ニコン OPTIPHOT-2：WIB（U-MWIB）

或いは、蛍光に対する検出感度が上記の 2 機種の条件と同等の機器設定を用いる。

2）方法

2 施設以上の共同実験により実施する。

7．今後の課題

1）国内標準品の作製を何処が担うかが課題である。

2）標準化の維持の方法

現在抗核抗体の日常検査においては、標準品を用いていない。また、蛍光抗体法という方法の特性から、術者の熟練度が結果に影響を与える。

柱 2 での標準操作法の検討が必要と思われる。

3）カットオフ値の設定

現在最も多く使用されているカットオフ値 40 倍は、健常者陽性率が 20%と高いことから、診断効率に問題がある可能性が高い。柱 3 での臨床的感度、特異性の検討が必要である。

8．結び

平成 17 年度の調査、平成 18 年度および平成 19 年度の実験研究において、抗核抗体の標準化の方向性の探求を行い、校正物質の使用により標準化が可能であることを確認できた。また、国内標準物質の作製プロトコルを提案した。

国内標準物質の作製に向けた具体的作業を、学会、企業団体の協力の基に実行することが望まれる。

参考文献

1) 知的基盤創成・利用促進研究開発事業　臨床検査用標準物質の研究開発　平成 17 年度成果報告書　（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構
2) 知的基盤創成・利用促進研究開発事業　臨床検査用標準物質の研究開発　平成 18 年度成果報告書　（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構
3) Anderson SG, Addison IE, Dixon HG：Antinuclear-Factor Serum(Homogeneous):An International Collaborative Study of the proposed research standard 66/233. Ann.N.Y.Acad.Sci.177：337-345, 1971
4) 2004 年度自己抗体精度管理報告書　抗核抗体　（株）医学生物学研究所　2005
5) 熊谷俊一：自己免疫検査の効率的利用法の研究。厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）総括研究報告書、平成 16 年度　総括研究報告書　主任研究者　熊谷俊一、p1-21、平成 17 年（2005 年）3 月

2-4-2-2　リウマトイド因子（　RF）

要旨

1）リウマトイド因子（rheumatoid factor 以下 RF）は、RA（慢性関節リウマチ）の診断基準に入っており、RA のスクリーニング検査として広く臨床に使用されている。しかし、リウマトイド因子自身に関する明確な定義はなく、Fc と反応する自己抗体である。このため、RF 自身の持つ多様性（親和性と結合力の違い）と測定試薬の違いから標準化が難しい。また、同じ試薬を使用していても臨床判断値（カットオフ値）が異なるケースもあり、同じ RF という検査でありながら施設により測定値および臨床判断値も異なっており、診療現場での混乱を招いている。

2）過去に行われた RF の標準化に関する調査研究においては、WHO 標準品[1)]自身の反応性が、患者検体と異なるために、各社測定値の互換性の確保は非常に難しいという結論であった。すなわち、各社の測定値を WHO 標準品から伝達されるようにトレーサビリティ体系が維持されたとしても、測定対象となる患者試料中の RF に多様性があるために、WHO 標準品と互換性のない試料は測定値が異なる結果になった。

3）2006 年度は、各社試薬で共通試料（健診群・RA 群・慢性肝疾患の 3 群を各 200 例）を測定することにより現状の確認を行い、標準化の方向性を再検討するために共同実験を実施した。患者検体の測定値を標準化することは難しいため、共通の臨床判断値が設定可能かどうかについて検討を進めた。このときに収集された健診の検体については、年齢情報が入手できなかったため、カットオフ値が高めに設定された理由を、解析することができなかった。

4）2007 年度は、再度年齢および性の情報が入手可能な検体を 2 種類（健診検体 1000 例、ボランテア検体 293 例）準備し、片側 5 %のカットオフ値を再検討した。

5）2006 年度と 2007 年度に検討したカットオフ値に乖離がでたことから、年齢分布などの健診の収集方法に違いがあることが示唆された。このため、安定したカットオフ値を求めるための条件を設定するために、性別、年齢別、喫煙習慣の影響について検討を行った。

6）健診の定義を明確するために、市原が開発した潜在基準値除外法を使用した。潜在基準値除外法を実施するために、RF と関係の深い生化学検査 7 項目（TP、ALB、AST、ALT、LD、GGTP、ZTT）および免疫検査 1 項目（CRP）を同時に測定した。

7）RF 標準品を作製することが難しいため、各社の測定値に大きな乖離がでないパネル検体の作製を試みた。

8）11 社 17 試薬で算出した RF カットオフ値の平均が 14.7 IU/mL であったことから、共通カットオフ値は 15IU/mL に設定可能であることが示唆された。

1．目的

1）2006 年の検討結果に基づき、より厳格に健診を定義、選択し、各社共通の RF カットオフを設定する。

2）各社共通の RF カットオフ値の維持のためのパネル血清を作製する。

2．委員会の構成

	氏名	所属
責任者	斉藤　憲祐	デイド・ベーリング株式会社
運営管理者（臨薬協）	山本 茂一	株式会社カイノス
柱 1／C3 担当	嶋本 三利	株式会社三菱化学ヤトロン
技術アドバイザー	熊谷 俊一	神戸大学大学院　教授
技術アドバイザー	小柴 賢洋	兵庫医科大学　教授
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院　准教授
技術アドバイザー	森下 芳孝	三重大学病院中央検査部技師長
技術担当者	新井 次郎	株式会社医学生物研究所
技術担当者	松内　和洋	株式会社エイアンドティー
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	倉持 啓一	株式会社エスアールエル
技術担当者	大塚　一郎	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
技術担当者	日向　隆	株式会社カイノス
技術担当者	北村 竜太郎	極東製薬工業株式会社
技術担当者	船越 國宏	シスメックス株式会社
技術担当者	根占 哲也	株式会社セロテック
技術担当者	斉藤 憲祐	デイド・ベーリング株式会社
技術担当者	鎌田 祥子	デンカ生研株式会社
技術担当者	高橋 義孝	日水製薬株式会社
技術担当者	松坂 啓之	日東紡
技術担当者	波多野 裕通	株式会社日本凍結乾燥研究所
技術担当者	藤居　賢	日本ﾊﾞｲｵ・ﾗｯﾄﾞﾗﾎﾞﾗﾄﾘｰｽﾞ株式会社
技術担当者	伊東 理絵	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	野村 昭夫	株式会社三菱化学ヤトロン

3．委員会の開催

29 第 1 回会合：2005/11/07（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
30 第 2 回会合：2005/12/07（水）11：00～13：00　（臨薬協会議室）
31 第 3 回会合：2006/01/17（火）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
32 第 4 回会合：2006/03/10（金）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
33 第 5 回会合：2006/04/18（火）13：00～14：14　（臨薬協会議室）
34 第 6 回会合：2006/08/02（水）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
35 第 7 回会合：2006/09/26（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）

36 第 8 回会合：2006/12/22（金）15：00～17：00　（三菱化学ヤトロン会議室）
37 第 9 回会合：2007/04/25（水）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
38 第 10 回会合：2007/06/12（水）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
39 第 11 回会合：2007/08/28（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
40 第 12 回会合：2007/11/27（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
41 第 13 回会合：2008/01/15（火）13：00～15：10　（臨薬協会議室）
42 第 14 回会合：2008/02/20（水）13：00～15：10　（臨薬協会議室）

4．調査研究の概要

4－1 測定値の互換性の現状

① 昭和 63 年 12 月～平成 7 年 1 月で RF 標準化委員会（厚生省「診断用生物学的製剤等基準作製」班）が行われ、平成 9 年 2 月「日本リウマチ学会誌」に「リウマトイド因子測定値の標準化について」[2] として報告されていた。

② その後、リウマチ学会・検査医学会などによって標準化アンケートおよびサーベイ検討が実施され各種報告がなされている。（最近では平成 17 年に　厚生労働科学研究補助金医療技術評価総合研究事業　自己抗体の効率的利用法に関する研究「リウマチ因子、抗核抗体の標準化に関する全国アンケート調査およびサーベイ結果報告」[3,4] として報告されている。）

いずれの報告も RF 自身に多様性が存在するなど、抗体検査の標準化に関する問題点が示されており、各試薬の測定値の互換性を確保することの難しさが確認された。

4－2 市販キットのトレーサビリティおよびカットオフ値の現状

各社 RF 値付けの基準は、WHO 標準品「64/1(2)」（1970 年制定）25 IU/mL（4 mL での溶解時）より値付けされたものであった。しかし、各社から提示されている参考基準範囲は各々の定義により 5～23 U/mL（スライド凝集法を除く）と幅広く設定されており、各社のカットオフ値の平均は 15 IU/mL であった。

4－3 キット差の要因について

各試薬に使用されている抗原はヒト由来の IgG（ウサギ IgG を混合使用した試薬もある）を変性した物であるが、担体の有無および製造方法の違いにより測定物である抗体との反応性が異なっていると思われる。また、抗原にヒト由来の IgG を使用している場合においても、熱変性の方法が異なるために反応性が異なる可能性も示唆されている。現状では全ての試薬キットが WHO 標準品を基準にしているが、同一の WHO 標準品を用いても各試薬に対する反応性が異なるため、測定値の標準化を難しいものにしていると思われる。

さらに検出系も、ラテックス免疫凝集法や比ろう法、免疫比濁法など様々であり、その影響も考えられる。

4－4標準化に向けた実行計画

4－4－1実行計画

① 2006 年の検討結果に基づき、より厳格に健診を定義および選択し、各社共通の RF カットオフを設定する。

② 各社共通の RF カットオフ値を維持するためのパネル血清を作製する。

4－4－2実施内容

1．健診群の規定は、潜在基準値除外法（市原清志教授）を実施するために、以下の条件を満たす試料を収集した。

1）日本人成人の血清であること

2）肝機能検査（AST,ALT,GGTP,LDH）が正常であること

3）グロブリン（TP,ALB,ZTT）が正常であること

4）炎症(CRP)が正常であること

5）健康診断の問診結果は入手できないため、RA の既往は不明であった。

6）患者情報（年代、性）を確認する。高齢者（70 歳以上）は除外した。

7）男女同数で目標検体数は男女各 500 例

8）血清量は、各 2 mL 以上

2007 年に収集された健診の検体は昨年と同じ健診施設で収集された。2007 年度は 2006 年度の情報に年代情報を追加することができた。

本 WG のアドバイザーの先生方の協力を得て、上記の規定を満たすボランテイア検体を入手した。

- 神戸大学（熊谷先生)、兵庫医大（小柴先生)、産業医大（太田先生）
- 名古屋大学（森下先生）

また、本 WG 参加の施設に依頼をして、ボランティア検体を入手した。

- 同意書（安全性についての記述）の作製（別紙１）
- 問診表の作製（別紙２）
- 採血および採血後の血清処理については、各企業で実施した。
- 採血用の器材は、WG でまとめて購入し、各企業に配布した。

潜在基準値除外法を実施するための検査（AST、ALT、GGTP、LDH、TP、ALB、ZTT、CRP）は、オリエンタル酵母工業（株）長浜研究所にて、栄研化学の試薬（機種：日立 7170）で一括して測定した。

2－1．健診パネルおよびボランティアパネルの作製

1）1000 人分の健診検体（各 2mL）を使用した。

2）10 社の試薬で測定後、試薬間の CV が 100 %未満の検体だけを選択した。

3）10 社の平均値が大きい順に並べ替えた。

4）平均値が大きい順に、約 10 本毎にプール血清（約 20 mL）を作製した。
5）99 本のプール血清が作製された。
6）プール血清の遠心処理（15,000×g、10 分間）およびろ過処理を実施した。
7）処理後のプール血清を 0.3 mL ずつ小分けした。
8）－ 40 ℃以下で凍結保存した。

同じ方法で、ボランテア検体 293 人分の試料からパネル検体 44 本を作製した。

2-2． RA 患者パネルの作製

1）72 人分の RA 検体（各 2 mL）を使用した。
2）10 社の試薬で測定後、試薬間の CV が 50 %未満の検体だけを選択した。
3）10 社の平均値が大きい順に並べ替えた。
4）平均値が大きい順に、約 10 本毎にプール血清（約 20 mL）を作製した。
5）6 本のプール血清が作製された。
6）プール血清の遠心処理（15,000×g、10 分間）およびろ過処理を実施した。
7）処理後のプール血清を 0.3 mL ずつ小分けした。
8）－ 40 ℃以下で凍結保存した。

3．測定方法

1 社でも多くの企業に参加して頂くために、オリエンタル酵母工業（株）での集中測定を実施した。

集中測定に参加した企業は 10 社 15 試薬であった。

ベックマン社は専用機の Immage と UniCel での参加なので、集中測定で残った試料を送付し、後日測定した。このため、パネル検体を選択するための測定値には含むことができなかった。

4．健診検体、ボランティア検体、RA 検体の入手

1）健診検体は昨年と同じ検体入手施設に JCCLS から依頼し、年代と性別のみ既知の 1000 検体（男性 500 例、女性 500 例）を入手した。
2）本 WG のアドバイザーの先生方（神戸大学（熊谷先生)、兵庫医大（小柴先生)、産業医大（太田先生)、名古屋大学（森下先生）および WG 参加企業の協力を得て、上記の規定を満たすボランティア検体を 293 例入手した。
3）本 WG のアドバイザーの先生方（神戸大学（熊谷先生)、兵庫医大（小柴先生)、産業医大（太田先生）の協力を得て、RA 検体を 72 例入手した。

健診検体、ボランティア検体および RA 検体を、潜在基準値除外法を実施した結果の症例数を表 1 に示す。生化学項目 8 項目の全てが添付文書に記載されている基準範囲から外れている検体を除外すると 30 %程度まで検体数が減少するため、市原先生のこれまでの経験か

ら少し基準を広げた方法を追加した。

表1．対象症例数と潜在基準値除外法による選択

例数	健常者	RA	ボランテア
全数	999	72	293
市原先生の調整	892	72	237
潜在基準値除外	322	5	96

比率	健常者	RA	ボランテア
全数	100%	100%	100%
市原先生の調整	89%	100%	81%
潜在基準値除外	32%	7%	33%

５．測定結果

１）喫煙の影響

健診検体には喫煙習慣に関する情報が不明なので、喫煙習慣に関する情報が収集できたボランティア検体を使用して、喫煙の影響について解析を実施した。喫煙群 24 例と非喫煙群 162 例の比較をそれぞれの平均値で比較および検定したところ、喫煙習慣による差は観察されなかった。

表2．ボランテア症例での喫煙の影響（市原の調整）

			RF 平均値		
No	メーカー	原理	非喫煙(162)	喫煙(24)	全部(186)
1	M	LIA	3.0	3.2	3.6
2	B	LIA	0.8	0.4	0.9
3	G	LIA	2.0	1.6	2.4
4	F	LIA	4.9	4.5	5.2
5	C	LIA	5.2	5.5	5.7
6	I	LIA	2.6	2.7	3.5
7	E	LIA	6.7	7.3	7.7
8	A	LIA	0.4	0.6	0.8
9	O	LIA	0.5	0.6	0.9
10	N	TIA	0.8	-0.8	1.3
11	J	TIA	2.4	2.3	2.8
12	H	TIA	3.9	3.2	4.3
13	D	LIA	6.0	5.8	6.4
14	L	LIA	14.1	16.3	14.1
15	K	LIA	17.3	20.2	17.3
16	P	LIA	4.9	5.6	5.4
17	Q	LIA	4.4	4.9	4.8
		平均	4.7	4.9	5.1
		平均値	3.5	3.5	4.0

P<0.01

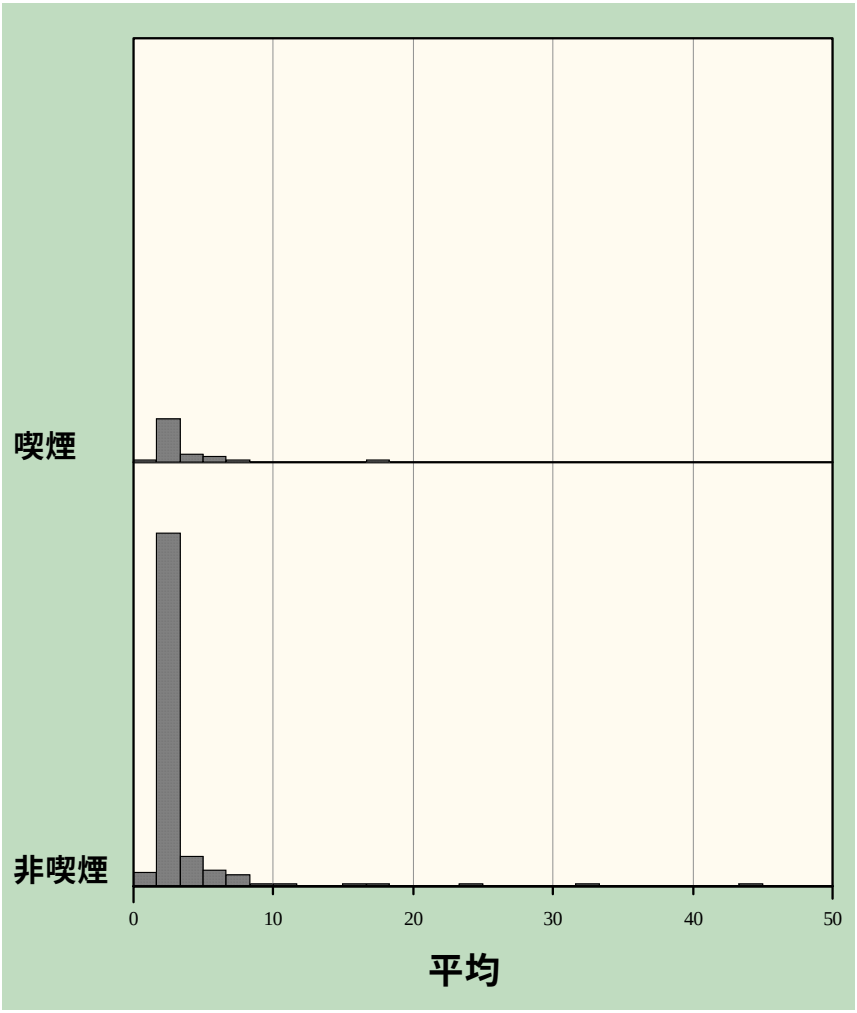


図１　喫煙群と非喫煙群の比較（17 試薬の平均値）

２）性別の影響

性別に関する情報は、健診検体およびボランティア検体において入手できたので、両方の母集団を使用して、性別の平均値からその影響を解析した。健診検体において、試薬 P および Q だけが有意差を認めたが、それ以外の試薬では性別の影響は認められなかった。また、ボランティア検体においては、いずれの試薬でも性別の影響は認められなかった。

表3．健診症例での性差（市原の調整）

			RF 平均値		
No	メーカー	原理	男性(428)	女性(464)	全部(892)
1	M	LIA	4.5	3.9	4.2
2	B	LIA	2.4	1.6	2.0
3	G	LIA	5.4	4.4	4.8
4	F	LIA	6.8	6.3	6.5
5	C	LIA	7.0	5.7	6.3
6	I	LIA	3.9	3.2	3.5
7	E	LIA	11.6	11.9	11.8
8	A	LIA	1.5	1.1	1.3
9	O	LIA	1.7	1.7	1.7
10	N	TIA	2.9	2.6	2.8
11	J	TIA	4.1	2.4	3.2
12	H	TIA	6.3	4.8	5.5
13	D	LIA	9.6	7.2	8.4
14	L	LIA	13.0	12.0	12.5
15	K	LIA	18.2	16.0	17.6
16	P	LIA	9.6	*6.6	8.1
17	Q	LIA	8.5	*5.9	7.2
		平均	6.9	5.7	6.3
		平均値	6.3	5.1	5.7

P<0.01

表4．ボランテア症例での性差（市原の調整）

			RF 平均値		
No	メーカー	原理	男性(94)	女性(119)	全部(213)
1	M	LIA	3.1	3.2	3.6
2	B	LIA	0.8	0.7	0.9
3	G	LIA	2.0	2.1	2.4
4	F	LIA	4.8	5.1	5.2
5	C	LIA	5.5	5.1	5.7
6	I	LIA	2.7	2.9	3.5
7	E	LIA	7.7	6.5	7.7
8	A	LIA	0.6	0.5	0.8
9	O	LIA	0.7	0.7	0.9
10	N	TIA	-0.1	1.5	1.3
11	J	TIA	2.5	2.5	2.8
12	H	TIA	3.9	3.9	4.3
13	D	LIA	6.0	6.1	6.4
14	L	LIA	12.4	15.1	14.1
15	K	LIA	15.6	18.1	17.3
16	P	LIA	5.3	4.9	5.4
17	Q	LIA	4.8	4.4	4.8
		平均	4.6	4.9	5.1
		平均値	3.5	3.6	4.0

P<0.01

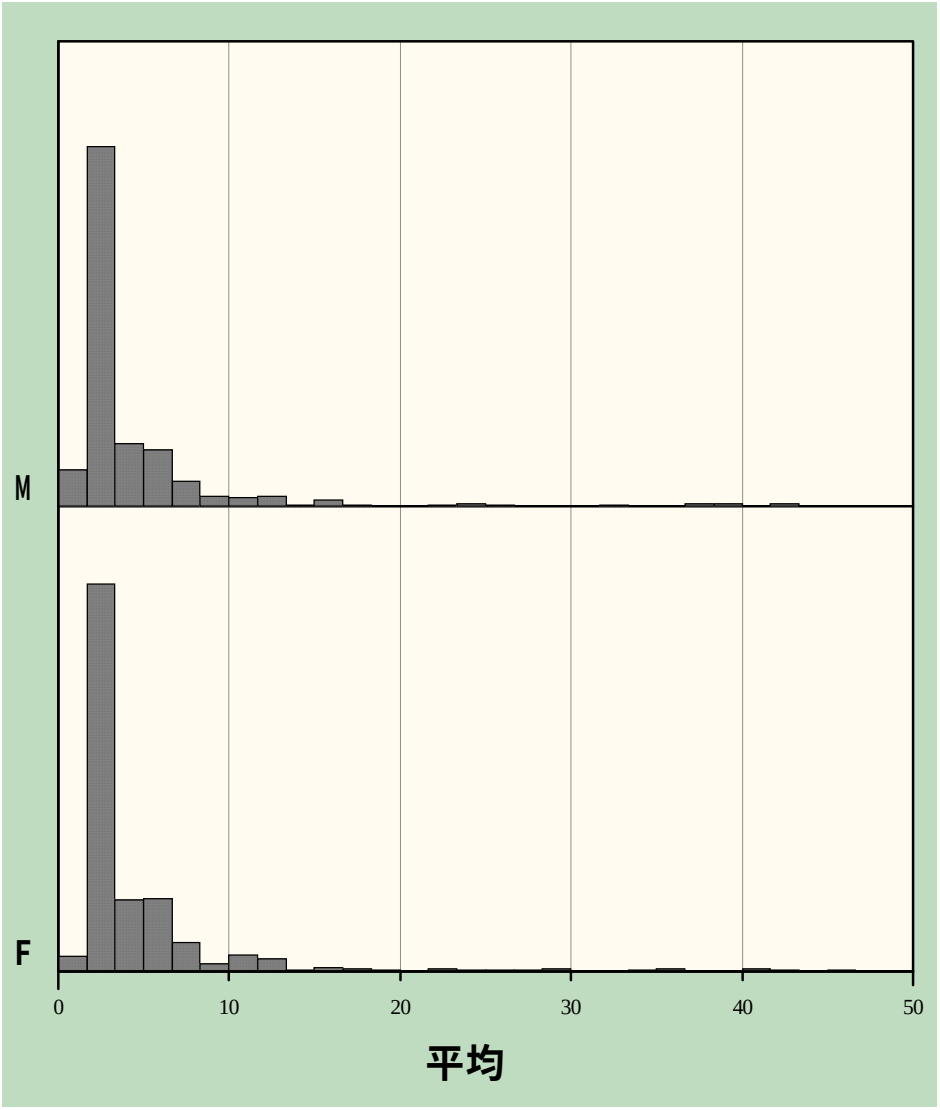


図 2　性別の比較（17 試薬の平均値）

３）年齢の影響

年齢に関する情報は、健診検体およびボランティア検体において入手できたので、両方の母集団を使用して、年齢別の平均値からその影響を解析した。尚、健診検体が持っている年齢に関する情報は、29 歳以下、30- 49 歳、50- 69 歳の 3 段階なので、ボランティア検体の年齢についても同じ基準で 3 段階に分類した。健診検体において、試薬 B、G、F、I および E だけが 50- 69 歳で有意な高値を認めたが、それ以外の試薬では性別の影響は認められなかった。また、ボランティア検体においては、いずれの試薬でも年齢の影響は認められなかった。

表5．健診症例での年齢差（市原の調整）

			RF 平均値			
No	メーカー	原理	<29(280)	30-49(352)	50-69(260)	全部(892)
1	M	LIA	3.2	4.3	5.3	4.2
2	B	LIA	0.8	1.8	*3.4	2.0
3	G	LIA	3.1	4.5	*7.2	4.8
4	F	LIA	5.5	6.2	*8.1	6.5
5	C	LIA	5.2	6.2	6.7	6.3
6	I	LIA	2.3	3.7	*4.5	3.5
7	E	LIA	8.5	10.1	*17.6	11.8
8	A	LIA	5.8	6.0	8.8	1.3
9	O	LIA	1.0	1.0	3.4	1.7
10	N	TIA	1.7	2.8	3.8	2.8
11	J	TIA	2.4	3.4	3.8	3.2
12	H	TIA	4.0	5.5	7.2	5.5
13	D	LIA	6.2	8.9	10.0	8.4
14	L	LIA	11.0	12.8	13.7	12.5
15	K	LIA	14.0	17.7	19.5	17.6
16	P	LIA	7.5	7.0	10.1	8.1
17	Q	LIA	6.7	6.2	9.0	7.2
		平均	5.2	6.4	8.4	6.3
		平均値	4.3	5.4	*7.6	5.7

*P<0.01

表6．ボランテア症例での年齢差（市原の調整）

			RF 平均値			
No	メーカー	原理	<29(85)	30-49(97)	50-69(31)	全部(213)
1	M	LIA	2.8	3.1	4.8	3.6
2	B	LIA	0.6	0.7	1.7	0.9
3	G	LIA	1.6	1.9	3.7	2.4
4	F	LIA	4.5	5.1	6.0	5.2
5	C	LIA	4.9	5.1	7.0	5.7
6	I	LIA	2.5	2.6	4.3	3.5
7	E	LIA	5.9	7.3	9.3	7.7
8	A	LIA	0.4	0.4	1.6	0.8
9	O	LIA	0.6	0.5	1.5	0.9
10	N	TIA	1.1	0.3	1.6	1.3
11	J	TIA	2.3	2.3	3.5	2.8
12	H	TIA	3.5	3.7	5.7	4.3
13	D	LIA	5.9	5.8	7.2	6.4
14	L	LIA	14.2	12.4	17.7	14.1
15	K	LIA	17.3	14.7	23.1	17.3
16	P	LIA	4.9	5.3	5.2	5.4
17	Q	LIA	4.3	4.7	4.7	4.8
		平均	4.5	4.5	6.4	5.1
		平均値	3.4	3.3	4.7	4.0

*P<0.01

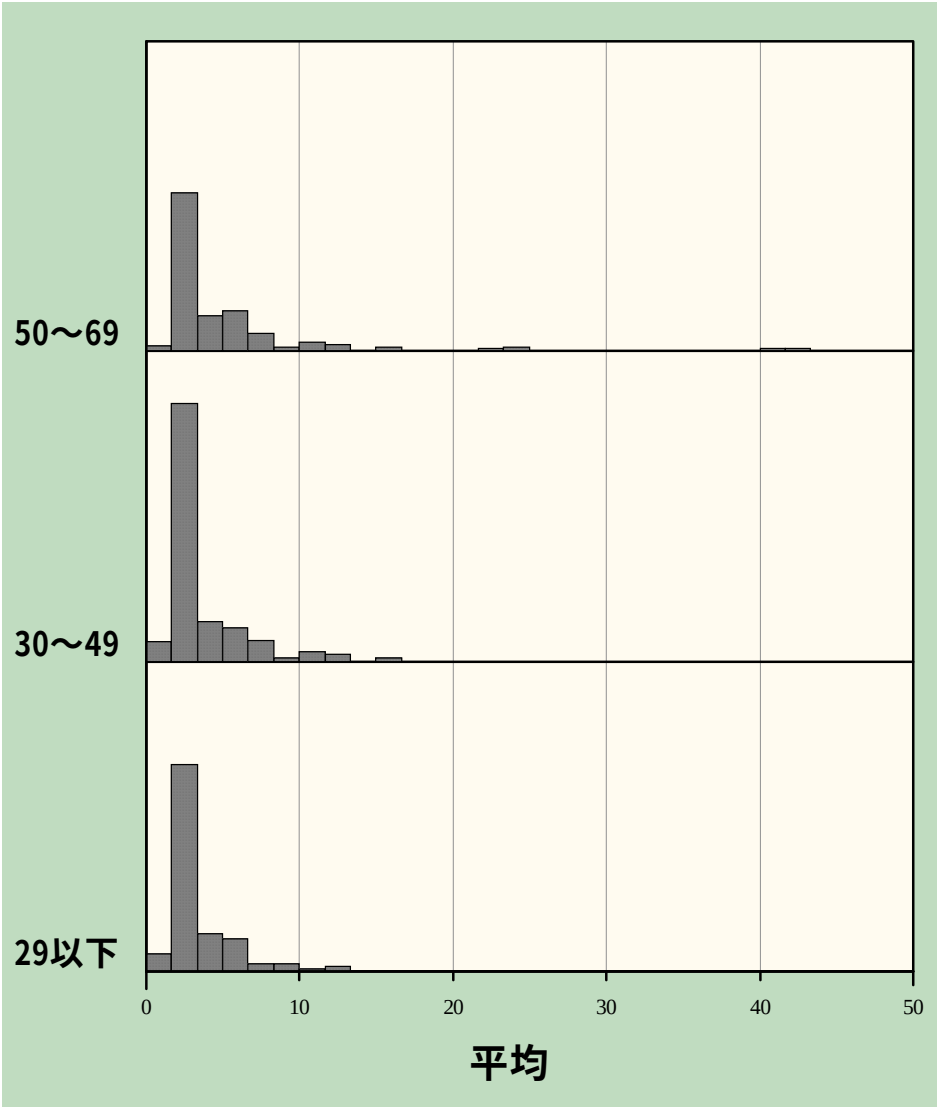


図３　年齢別の比較（17 試薬の平均値）

４）基準範囲上限の片側 5 %のカットオフ値

健診検体およびボランティア検体のそれぞれについて、全数、市原先生の調整後、潜在基準値除外法を使用後の試料を用いて、ノンパラメトリック法による上方片側 5%のカットオフ値を算出した。

健診検体を使用したカットオフの平均値については、全数で 15.0 IU/mL、市原先生の調整後で 14.7 IU/mL、潜在基準値除外法で 14.8 IU/mL といずれの結果もほぼ同じ 15.0 IU/mL であった。

ボランティア検体を使用したカットオフの平均値については、全数で 22.5 IU/mL、市原先生の調整後で 12.8 IU/mL、潜在基準値除外法で 14.3 IU/mL であった。全数での平均値が高くなったのは、ベックマン Immage のカットオフ値が 105 IU/mL と高値であったことが原因である。

どちらの母集団のどの集計結果でも大きなカットオフ値の違いは見られなかった。しかし、健常者としての定義を明確にする事を主な目的に、潜在基準値除外法により算出した RF のカットオフ値は、健診検体で 14.8 IU/mL、ボランティア検体で 14.3 IU/mL とほぼ同じ数値を得る事が

できた。

表7．RFカットオフ値（WHO補正前）				RF ノンパラメトリック法(片側上方5%)			RF ノンパラメトリック法(片側上方5%)		
No	メーカー	原理	WHO std	健診（999）	健診市原(892)	健診潜在(322)	ボランティア(293)	ボランティア市原（237	ボランティア潜在(96)
1	M	LIA	95.1	16.0	15.0	12.9	19.0	16.0	16.8
2	B	LIA	115.5	6.0	6.0	6.7	5.0	4.0	5.4
3	G	LIA	120.0	14.0	14.0	16.9	15.0	10.7	15.9
4	F	LIA	92.6	12.0	12.0	10.5	14.0	11.3	14.0
5	C	LIA	85.1	16.0	16.0	15.4	17.9	16.0	18.0
6	I	LIA	84.0	13.0	13.0	12.0	17.0	15.7	16.7
7	E	LIA	152.4	28.0	28.0	36.6	28.3	22.0	29.2
8	A	LIA	81.6	5.0	5.0	3.9	7.9	5.0	7.3
9	O	LIA	96.5	6.5	6.0	4.9	7.9	5.7	7.5
10	N	TIA	103.0	12.0	12.0	12.0	11.9	9.3	11.7
11	J	TIA	96.0	11.0	11.0	10.2	12.4	10.0	13.9
12	H	TIA	87.0	17.6	17.5	16.5	13.9	14.0	16.0
13	D	LIA	102.9	20.0	20.0	17.3	17.9	15.7	16.3
14	L	LIA	-	10.0	10.0	10.0	67.9	10.0	10.0
15	K	LIA	-	42.6	41.0	40.3	105.0	31.6	23.9
16	P	LIA	117.5	13.0	13.0	13.9	12.0	11.0	10.6
17	Q	LIA	122.5	12.0	11.0	12.3	10.0	9.0	9.4
		平均		15.0	14.7	14.8	22.5	12.8	14.3
		平均値		14.6	14.0	13.5	15.7	12.3	15.5

表8．RFカットオフ値（WHO補正後）				RF ノンパラメトリック法(片側上方5%)			RF ノンパラメトリック法(片側上方5%)		
No	メーカー	原理	補正係数	健診（999）	市原(892)	1000潜在(322)	ボランティア(293)	市原（237）	ボランティア潜在(96)
1	M	LIA	1.1	16.8	15.8	13.6	20.0	16.8	17.7
2	B	LIA	0.9	5.2	5.2	5.8	4.3	3.5	4.7
3	G	LIA	0.8	11.7	11.7	14.1	12.5	8.9	13.3
4	F	LIA	1.1	13.0	13.0	11.3	15.1	12.2	15.1
5	C	LIA	1.2	18.8	18.8	18.1	21.0	18.8	21.2
6	I	LIA	1.2	15.5	15.5	14.3	20.2	18.6	19.9
7	E	LIA	0.7	18.4	18.4	24.0	18.5	14.4	19.2
8	A	LIA	1.2	6.1	6.1	4.8	9.6	6.1	8.9
9	O	LIA	1.0	6.8	6.3	5.2	8.3	6.0	7.9
10	N	TIA	1.0	11.7	11.7	11.7	11.5	9.0	11.4
11	J	TIA	1.0	11.5	11.5	10.6	12.9	10.4	14.5
12	H	TIA	1.1	20.2	20.1	19.0	15.9	16.1	18.4
13	D	LIA	1.0	19.4	19.4	16.8	17.3	15.2	15.8
14	L	LIA							
15	K	LIA							
16	P	LIA	0.9	11.1	11.1	11.8	10.2	9.4	9.0
17	Q	LIA	0.8	12.6	11.6	12.9	10.5	9.5	9.9
		平均		13.3	13.2	12.9	14.1	11.8	14.1
		平均値		15.4	14.7	14.2	16.5	12.9	16.3

収集した健常者の母集団によって、カットオフ値が異なる可能性があるので、今回収集された健診パネル、ボランティアパネルをランダムに抽出し、それぞれにおけるカットオフ値を算出した。

この検討結果においても、各社のカットオフ値の平均値は 14.7 IU/mL となり、RF のカットオフ値を算出するための健常者の検体を収集するための定義を明確にすれば、安定したカットオフ値が得られる可能性が示唆された。

表9. RF各社試薬基準範囲一覧
級幅:1　　ﾉﾝﾊﾟﾗﾒﾄﾘｯｸ法(片側上方5%)

	潜在基準値除外検体				市原先生の調整検体								
	検診322検体	ﾎﾞﾗﾝﾃｨｱ96検体	検診＋ボ418検	抽出258検体※	検診446検体①	検診446検体②	ﾎﾞﾗﾝﾃｨｱ237検体	MAX	MIN	MEAN	K,L除ｶ	抽出258検体※KL除いた平均
A	4.0	7.6	7.0	7.0	3.3	9.2	5.6	9.2	3.3	6.40	6.40	7
B	5.7	5.6	5.6	5.1	5.0	6.8	4.4	6.8	4.4	5.50	5.50	5.1
C	15.3	18.2	16.1	16.1	13.2	16.9	15.7	18.2	13.2	16.43	16.43	16.1
D	16.0	16.6	16.3	16.4	18.3	20.9	15.6	20.9	15.6	16.33	16.33	16.4
E	33.5	30.3	30.8	30.5	29.8	23.4	22.1	33.5	22.1	31.28	31.28	30.5
F	10.7	14.1	11.5	10.7	10.2	13.9	11.1	14.1	10.2	11.75	11.75	10.7
G	14.9	16.2	16.1	14.1	12.2	16.4	11.1	16.4	11.1	15.33	15.33	14.1
H	16.1	17.1	16.3	16.1	13.8	19.9	14.7	19.9	13.8	16.40	16.40	16.1
I	11.8	17.2	14.5	13.6	11.2	13.9	16.1	17.2	11.2	14.28	14.28	13.6
J	9.9	14.6	11.0	10.7	8.9	11.8	10.5	14.6	8.9	11.55	11.55	10.7
K	36.5	24.2	35.0	43.1	34.9	44.8	30.7	44.8	24.2	34.70		
L	11.0	11.0	11.0	20.1	11.0	11.0	11.0	20.1	11.0	13.28		20.1
M	12.7	17.2	14.5	14.4	13.4	16.9	16.1	17.2	12.7	14.70	14.70	14.4
N	11.0	12.2	12.0	12.5	8.9	14.8	10.0	14.8	8.9	11.93	11.93	12.5
O	5.2	7.6	6.4	6.2	5.1	11.0	5.6	11.0	5.1	6.35	6.35	6.2
P	13.0	10.6	12.5	12.3	12.5	13.5	10.6	13.5	10.6	12.10	12.10	12.3
Q	12.0	9.6	11.2	11.0	11.0	11.9	9.6	12.0	9.6	10.95	10.95	11
								平均		14.7	13.4	13.55
								MAX		34.7	31.3	
								MIN		5.5	5.5	
								SD		7.7	6.2	
								MEAN+3SD		37.85	31.87	
								MEAN-3SD		-8.53	-5.04	
								MEAN+2SD		30.12	25.72	
								MEAN-2SD		-0.8	1.116	

※以下の表の通り、各年代を均等になるようランダムに抽出した

	20代以下	30～40代	50～60代	
男性	43	43	43	合計
女性	43	43	43	258

5）ROC 曲線から算出したカットオフ値

健診検体と RA 検体による ROC 曲線から求めたカットオフの平均値は 16.0 IU/mL であり、ボランティア検体と RA 検体による ROC 曲線から求めたカットオフの平均値は 15.6 IU/mL であった。

表10. ROCから算出したRFカットオフ値 (WHO補正前)

No	メーカー	原理	WHO std	健常者ROC	ﾎﾞﾗﾝﾃｲｱROC
1	M	LIA	95.1	19.0	19.0
2	B	LIA	115.5	5.0	5.0
3	G	LIA	120.0	17.0	17.0
4	F	LIA	92.6	10.0	10.0
5	C	LIA	85.1	15.0	13.0
6	I	LIA	84.0	13.0	12.0
7	E	LIA	152.4	28.0	24.0
8	A	LIA	81.6	17.0	16.0
9	O	LIA	96.5	18.0	18.0
10	N	TIA	103.0	13.0	13.0
11	J	TIA	96.0	10.0	10.0
12	H	TIA	87.0	12.0	12.0
13	D	LIA	102.9	15.0	15.0
14	L	LIA	-	21.0	28.0
15	K	LIA	-	29.0	24.0
16	P	LIA	117.5	16.0	15.0
17	Q	LIA	122.5	14.0	15.0
		平均		16.0	15.6
		平均値		11.0	11.0

6）パネル検体の測定結果

2－1および2－2の方法で準備した健診パネル、ボランティアパネルおよび　RA パネルを各社のキットで測定し、キット間の平均値、標準偏差と変動係数を算出した。健診パネルおよびボ

ランティアパネルについては、各社キットでの変動係数が 100 %未満の検体を選別し、プール血清を作製したにもかかわらず、プール血清におけるキット間の変動係数は 50%未満であった。このことは、個々の患者検体については、RF の多様性から各社試薬との反応性に差がでやすいが、10 検体ほどのプール血清であっても、RF の多様性が平均化されることにより測定結果の収束性につながった事が示唆された。

また、健診パネル、ボランティアパネルにおいて、キット間の変動係数が 100 %を超える検体を除外したことで、多様性のある RF の中でも特殊な反応性を持つ RF を除外することができたものと推測できる。

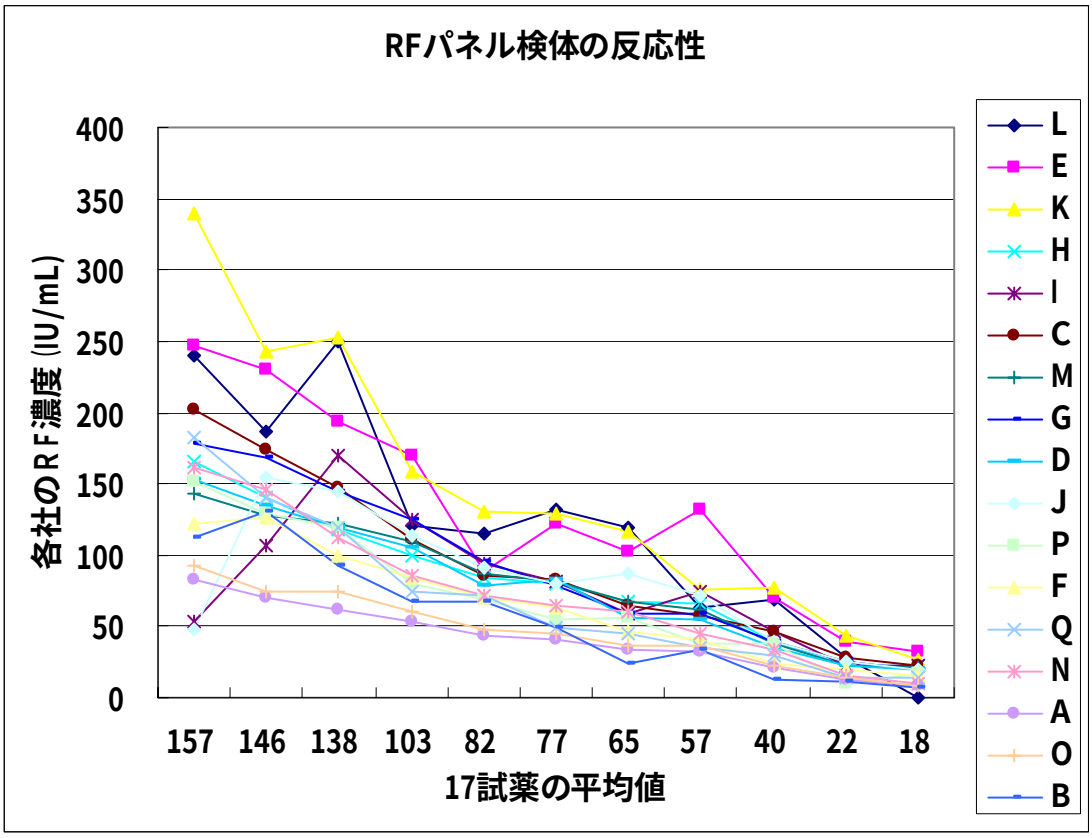


図 4　RF パネル検体の反応性（RF15 試薬）

表11．RFパネル検体の測定値（RF17試薬）

No.	RA-1	1	RA-2	RA-3	RA-4	RA-5	ﾎﾞ-1	RA-6	2	3	ﾎﾞ-2
平均値×1.2	189	175	165	123	98	93	78	69	48	27	22
平均値	157	146	138	103	82	77	65	57	40	22	18
平均値×0.8	126	117	110	82	65	62	52	46	32	18	14
L	240	187	250	120	115	132	119	63	69	28	<20.0
E	247	231	193	170	88	122	103	132	70	39	32
K	340	243	253	159	131	129	117	76	77	44	27
H	166	141	119	99	84	80	67	67	40	23	23
I	53	107	170	125	94	82	59	74	46	23	22
C	203	175	147	111	86	83	64	57	47	28	22
M	143	128	122	110	87	82	67	61	38	22	22
G	178	168	145	125	95	78	59	58	39	25	20
D	153	135	119	106	79	83	56	54	35	23	20
J	48	154	144	114	91	80	87	71	40	25	19
P	152	129	120	80	69	55	57	39	38	10	17
F	122	126	100	85	70	63	47	40	24	20	16
Q	182	141	120	75	72	50	45	36	30	14	14
N	162	146	112	86	72	64	60	45	34	15	10
A	83	70	62	53	44	41	33	32	22	13	9
O	93	74	74	61	48	45	37	36	22	14	9
B	112	131	93	67	67	49	24	33	12	11	8
平均値	157.3	146.1	137.7	102.8	81.8	77.5	64.8	57.3	40.1	22.1	17.9
SD	73.9	45.8	53.5	32.3	21.4	28.0	27.4	24.3	17.7	9.4	6.9
CV	47%	31%	39%	31%	26%	36%	42%	42%	44%	42%	38%

平均値±20 %の範囲に入った試料をブルー、平均値＋20 %以上の試料をレッド、平均値-20 %以下の試料をイエローで分類したところ、＋20 %以上のキットが 3 キット、－ 20 %以下のキットが 3 キット存在することが確認できた。

これらのキットには値付けにおける何らかの課題が含まれている可能性があるので、暫定的に除外し再集計した。その結果、キット間の変動係数は 11 %～27%とかなり収束していることが示された。

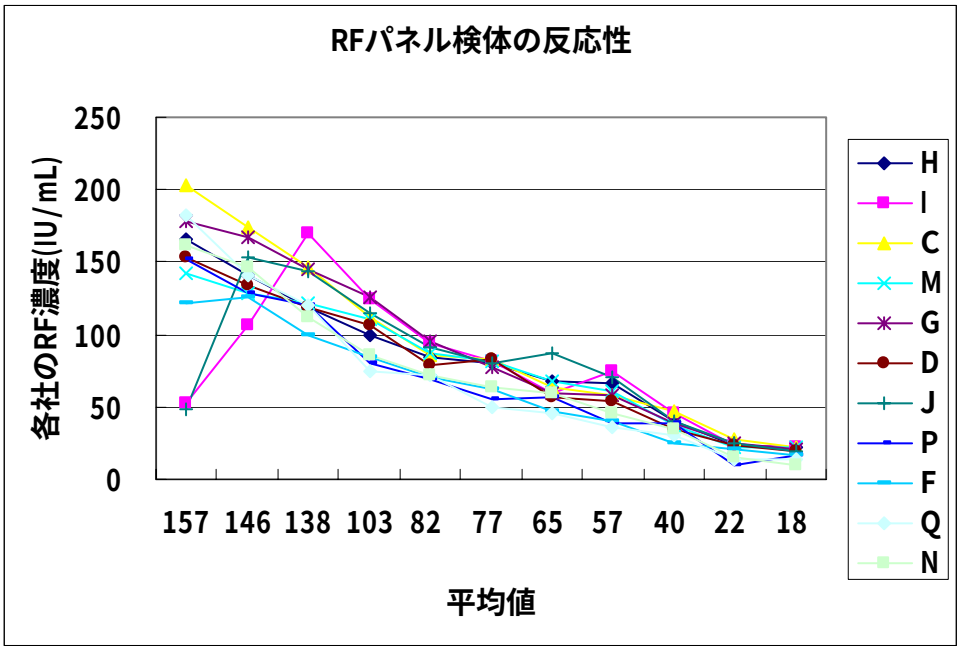


図 5　RF パネル検体の反応性（RF11 試薬）

表12．RFパネル検体の測定値（RF11試薬）

No.	RA-1	1	RA-2	RA-3	RA-4	RA-5	ﾎﾞ-1	RA-6	2	3	ﾎﾞ-2
平均値×1.2	189	175	165	123	98	93	78	69	48	27	22
平均値	157	146	138	103	82	77	65	57	40	22	18
平均値×0.8	126	117	110	82	65	62	52	46	32	18	14
平均値	157	146	138	103	82	77	65	57	40	22	18
H	166	141	119	99	84	80	67	67	40	23	23
I	53	107	170	125	94	82	59	74	46	23	22
C	203	175	147	111	86	83	64	57	47	28	22
M	143	128	122	110	87	82	67	61	38	22	22
G	178	168	145	125	95	78	59	58	39	25	20
D	153	135	119	106	79	83	56	54	35	23	20
J	48	154	144	114	91	80	87	71	40	25	19
P	152	129	120	80	69	55	57	39	38	10	17
F	122	126	100	85	70	63	47	40	24	20	16
Q	182	141	120	75	72	50	45	36	30	14	14
N	162	146	112	86	72	64	60	45	34	15	10
平均値	141.8	140.7	128.9	101.5	81.6	72.5	60.7	54.7	37.3	20.7	18.5
SD	49.9	19.4	20.1	17.8	9.8	12.4	11.3	13.3	6.5	5.5	4.0
CV	35%	14%	16%	18%	12%	17%	19%	24%	17%	27%	22%

また、表 11 の各社のデータを、各社で算出された RF カットオフ値と共通の RF カットオフ値 15 IU/mL との比で補正したところ、カットオフ値前後の測定値には補正効果が見られたが、RF 濃度 100 IU/mL 前後では補正効果が見られなかった(図 6、表 13)。

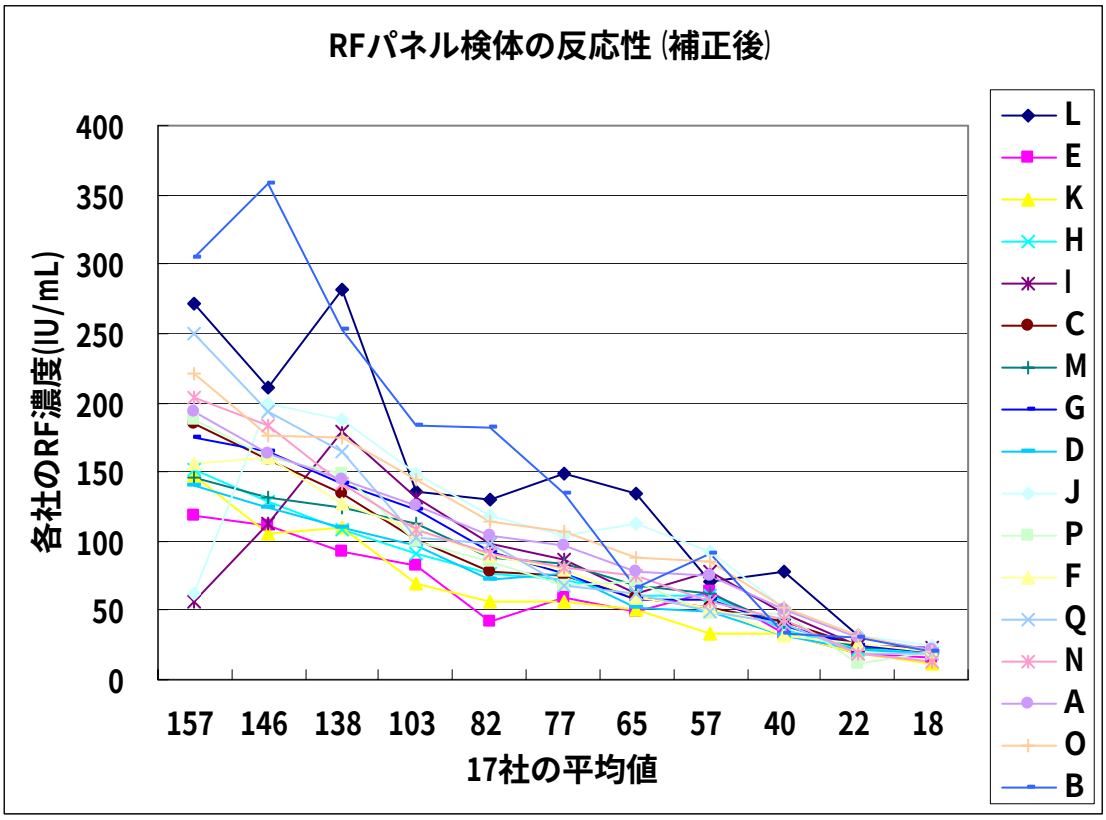


図 6　RF パネルの反応性（RF17 試薬・RF カットオフ値での補正後）

表13．RFパネル検体の測定値（RF17試薬・RFカットオフ値で補正）

No.	RA-1	1	RA-2	RA-3	RA-4	RA-5	ﾎﾞ-1	RA-6	2	3	ﾎﾞ-2
平均値×1.2	189	175	165	123	98	93	78	69	48	27	22
平均値	157	146	138	103	82	77	65	57	40	22	18
平均値×0.8	126	117	110	82	65	62	52	46	32	18	14
平均値	157	146	138	103	82	77	65	57	40	22	18
L	271	211	282	136	130	149	135	71	78	31	
E	118	111	93	82	42	59	49	63	34	19	15
K	147	105	109	69	57	56	51	33	33	19	12
H	151	129	108	91	77	73	61	61	37	21	21
I	56	112	179	131	99	86	62	78	48	24	23
C	185	159	134	102	78	75	59	52	43	25	20
M	146	131	124	112	89	83	68	63	38	23	22
G	174	164	142	123	93	76	58	57	38	24	20
D	141	124	110	97	72	76	52	50	32	21	18
J	62	200	187	148	118	104	113	92	52	32	25
P	188	160	149	99	85	68	70	48	47	12	21
F	155	160	128	108	90	80	59	51	31	26	20
Q	249	193	164	102	98	68	62	49	41	19	18
N	204	184	141	108	91	81	75	57	43	19	13
A	194	163	144	125	104	97	78	76	51	30	21
O	220	176	174	144	114	107	87	85	52	32	21
B	305	358	253	184	182	135	66	91	34	31	20
平均値	174.5	167.0	154.2	115.4	95.2	86.6	71.0	63.3	43.0	24.0	19.3
SD	65.7	58.8	50.5	27.8	31.1	25.2	22.6	16.6	11.5	5.8	3.5
CV	38%	35%	33%	24%	33%	29%	32%	26%	27%	24%	18%

５．まとめ

個々の患者試料では、RF の多様性があるために、使用する試薬により反応性が異なることから、同一患者試料をどの試薬で測定しても同じ測定結果を報告することは難しい。また、どの試薬で測定しても同じ測定結果を示すような RF 標準品の作製は難しい。

RF の標準化は難しい状況ではあるが、日常検査として広く普及している方法において、臨床の現場で混乱があることが指摘されているため、少しでも混乱を解消する方法を検討した。

今福らの調査によると同じ試薬を使用していても、施設によりカットオフ値が異なるケースがある。このため、測定値そのものが標準化されていたとしても、測定施設で採用しているカットオフ値が異なることから、同じ患者でも診療施設により陽性と判定されたり、陰性と判定されたりしている。この状況を改善するために、共通のカットオフ値が設定することができるかどうかを検討した。

今回、健診検体 1000 例、ボランティア検体 293 例による片側上方 5%によるカットオフ値の検討では 14.8　IU/mL と 14.3　IU/mL であった。RA 検体 72 例を使用した ROC 解析では 15.6 IU/mL であり、全てを平均すると 14.9 IU/mL であった。以上の検討結果から、各社が WHO 標準品からのトレーサビリティ体系を構築している現状において、共通のカットオフ値を 15.0 IU/mL に設定可能であることが示唆された。

各社の試薬が WHO 標準品からのトレーサビリティ体系を維持することで、現状は維持可能と思われるが、新しい試薬が発売された時に、現在市販されている試薬との互換性をどのように確認するかという課題が残る。現在の標準化システムを維持するためのツールとして、RF の持つ多様性を最小限に抑えたパネル検体が必要となる。このことから、RF の多様性を最小限に抑えたパネル検体を作製し、そのパネル検体を各社の試薬で測定することで、どの程度 RF の持つ多様性を解消し、試薬間による測定値の乖離を小さくできるかを検討した。

その結果、各社の測定値の変動係数が 50 %未満の RA 患者試料を、約 10 本毎にプールしたパネル検体を使用することで、各社の測定値の変動係数を 11 %～27 %程度に小さくすることが可能であった。パネル検体の凍結保存での安定性が確認されていないので、長期間の保存はできないが、同じ製法でパネル検体を作製することで、互換性を確認するための試料をいつでも作製することが可能と思われる。

６．結び

１）RF のカットオフ値を算出するために下記の条件を満たす健常者試料を収集することで、下記の各社で共通の RF カットオフ値（ノンパラメトリック法による片側上限 5 %）を、15 IU/mL に設定することが可能であった。

a) 日本人成人の血清であること
b) 肝機能検査（AST,ALT,GGTP,LDH）が正常であること
c) グロブリン（TP,ALB,ZTT,A/G 比）が正常であること
d) 炎症(CRP)が正常であること
e) 検体情報（年代、性）を確認し、高齢者（70 歳以上）は除外
f) 男女同数で目標検体数は男女各 500 例

２）１）で設定したカットオフ値を維持するためのパネル検体が下記の条件で作製可能であった。

a）リウマトイド因子陽性検体（RF 濃度 15 IU/mL 以上の検体）および RA 検体（RF 濃度 100 IU/mL 前後をターゲットとして 50～200IU/mL の範囲）の収集
b）図 5 に示されている 11 試薬(C,D,F,G,H,I,J,M,N,P,Q)の中から測定原理の異なる 6 試薬で測定後、試薬間の CV が 50 %未満の検体だけを選択
c）平均値が大きい順に並べ替え
d）平均値が大きい順に、約 10 本毎にプール血清を作製
e）プール血清の遠心処理（15,000×g、10 分間）およびろ過処理を実施
f）処理後のプール血清を 0.3 mL ずつ小分け
g）－ 40 ℃以下で凍結保存

文献

6) Anderson SG, Bentzon MW, Houba V et al：International Reference Preparation of rheumatoid arthritis serum. Bull WHO 42：311-318, 1970
7) 吉野田定美　他：リウマトイド因子測定値の標準化について、リウマチ 36(6)：819-829, 1996
8) 大田俊行：リウマトイド因子測定値の標準化に向けての基礎的検討。厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総合研究事業）分担研究報告書、平成 16 年度　総括研究報告書　主任研究者　熊谷俊一、pp29-32、平成 17 年（2005 年）3 月
9) 熊谷俊一：自己免疫検査の効率的利用法の研究。厚生労働科学研究費補助金（医療技術評価総

合研究事業）総括研究報告書、平成 16 年度　総括研究報告書　主任研究者　熊谷俊一、pp1-21、平成 17 年（2005 年）3 月
10) 今福　裕司、吉田　浩：リウマトイド因子の標準化と問題点、臨床病理 54（8）：853‐860、2006

2-4-2-3　黄体形成ホルモン　　（LH）

要旨

1）臨床検体を測定して測定値間差の現状把握を行うと共に、標準物質候補品を使用して測定値間差の収束性について検証を行った。

2）臨床検体を用いた共同実験の結果より、全社平均値に対する相関式の傾き＝0.81～1.26（平均 1.0)、キット間ＣＶ＝16.5 %であり、±20 %のキット間差あるものと推定された。

3）標準物質候補品での共同実験の結果より、下垂体由来抗原は理論濃度に近い測定値を示すキットが多かったが、リコンビナント抗原では全てのキットが理論濃度の１／２程度の測定値を示した。また、理論濃度に対する割合が系統的に変化しているキットも見られた。

5）標準物質候補品の測定結果を基に、各社キットの臨床検体測定値を校正して測定値是正の検証を行ったが、逆に収束度が悪化した。

6）収束度が悪化した原因としては、実検体と標準品抗原（下垂体由来およびリコンビナント）の特性に差があり、各キットの使用するキット中の抗体が、上記抗原の特性の差に対応できないものと考えられた。

7）実検体ベースの標準品を想定して各キットの校正を試みたところ、キット間ＣＶはＣＶ＝13.1 %と縮小する結果を得た。また相関性の傾きは、１２キット中１１キットで 0.90～1.10 の範囲内に入った。標準物質候補品としては、実検体ベースの標準品が最も適当であることが示された。

8）トレーサビリティ連鎖のモデルとして、公的標準物質（WHO）を適切なベースに添加して作成したものを上位標準品とし、マトリックスの影響が少ない複数の市販キットを用いた共同実験によってヒトプール血清（抗原未添加）を値付けしたものを校正用標準物質とする方法が考えられた。しかし、キットの選択方法、共通の標準物質に用いるヒトプール血清の性状などの選択条件や保存条件等、多くの課題が残されている。

１．目的

本調査研究項目群、C%-WG（プロラクチン、E2、LH、FSH、プロゲステロン、テストステロン）内のＬＨについて、「実試料系標準物質候補品を調製・使用し各社キットのデータの標準化について検証を行う」ことが本調査研究の目的である。

２．委員会の構成

本委員会は、調査研究項目群の柱１C5-WGで、メンバーの構成を下記に記す。なおＷＧ発足以降、メンバーの入れ替わりがあったため、下表は１９年度報告書作成時のメンバーとした。

	氏　　名	所　　属
アドバイザー	家入　蒼生夫	獨協医科大学
アドバイザー	小田桐　恵美	東京女子医科大学
アドバイザー	桑　克彦	筑波大学
アドバイザー	森下　芳孝	名古屋大学
アドバイザー	谷　渉	検査医学標準物質機構(ReCCS) （旧名：HECTEF ｽﾀﾝﾀﾞｰﾄﾞﾚﾌｧﾚﾝｽｾﾝﾀｰ）
責任者	塚本　久雄	東ソー株式会社
運営管理者	大和　隆	協和メデックス株式会社
実験項目担当者(FSH)	伊東　立雄	ｵｰｿ･ｸﾘﾆｶﾙ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社
実験項目担当者(LH)	御子柴　浩	オリンパス株式会社
実験項目担当者(LH)	譽田　大仁	三洋化成工業株式会社
実験項目担当者(FSH)	前田　英征	株式会社テイエフビー
実験項目担当者(E2)	伊東　理絵	ベックマン・コールター株式会社
実験項目担当者(E2)	山崎　智之	日水製薬株式会社
技術担当者	髙　瑛姫	アボットジャパン株式会社
技術担当者	齋藤　憲祐	デイド　ベーリング株式会社
技術担当者	坂本　純一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	梅田　和之	富士レビオ株式会社
技術担当者	三好　欣也	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	松本　幹雄	ﾛｼｭ･ﾀﾞｲｱｸﾞﾉｽﾃｨｯｸｽ株式会社

３．委員会の開催

第１回会合　：2005/11/15（火）14：00～16：15　（臨薬協会議室）
第２回会合　：2005/12/02（金）10：00～12：30　（臨薬協会議室）
第３回会合　：2006/01/12（木）13：00～17：30　（臨薬協会議室）
第４回会合　：2006/02/14（火）13：30～17：00　（臨薬協会議室）
第５回会合　：2006/03/23（木）13：30～17：30　（臨薬協会議室）
第６回会合　：2006/04/25（火）13：30～17：30　（臨薬協会議室）
第７回会合　：2007/09/25（月）14：00～18：00　（臨薬協会議室）
第８回会合　：2007/01/16（火）14：00～17：30　（臨薬協会議室）
第９回会合　：2007/02/20（火）13：30～16：30　（臨薬協会議室）
第 10 回会合：2007/04/04（水）14：00～16：00　（臨薬協会議室）
第 11 回会合：2008/01/25（金）13：30～17：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１測定値の互換性の現状

平成１８年度に実施したＬH調査研究では以下の結果が得られており、各社キットのＬH測定値には十分な収束が見られない現状が明らかとなっている。

①各社アンケートによる測定値間差の現状は、14 相関データ中７データでは傾きが±10 %以内である。しかし、他７データ中２データでは 20 %以上の差を示していた。また残り５データに関しても傾きが 0.84～1.18 であり、測定値間差が見受けられた。

②第 27 回イムノアッセイ検査全国コントロールサーベイの結果より、低濃度試料では 14 キット中１キットのみが±20 %以上の解離を示した。高濃度試料では３キットが±20 %以上の解離を示した。

４-２市販キットのトレーサビリティの現状

LH には２種類の WHO 推奨国際標品が存在し、NIBSC より発売されている。平成 18 年度に実施したＬH調査研究では、この国際標品と各社キットの「値付け」との関係について表１の通りの回答が得られている。

表1：各社キットの値付けアンケート結果　(回答数：13社)

NIBSC code68/40(WHO1st IRP)	4社
NIBSC code80/552(WHO2nd IS)	9社

以上の結果より、殆どのキットで WHO2nd IS（80/552）に基づいた値付けを行っている。なお WHO1st IRP（68/40）は、製造中止となっている。

４-３共同実験の実施

平成 18 年度に実施した LH 調査研究結果に基づき、本年度は各社参加による共同実験を実施して各社測定値の現状を把握すると共に、推奨できる標準品選定の可能性を検証する。

共同実施に際しての実行計画書は、「添付資料１」のとおりである。なお、検討に用いた実血清検体は、「JCCLS 標準化基本検討委員会　柱１：臨床検査用標準物質の研究開発」で測定するヒト検体についての見解（2006 年１月 10 日)」に従って配布した。

①実試料系標準物質候補品の作成

共同実験に用いる実試料系標準物質候補品として、以下の 4 系列の候補品を作成した。
なお、実試料系標準物質候補品の作製は検査医学標準物質機構（旧名：HECTEF スタンダードレファレンスセンター）に委託した。

	添加抗原（WHO 標準品）	ベース
系列１	NIBSC 2nd IS 80/552（下垂体由来）	トリス緩衝液

系列２	NIBSC 2nd IS 80/552（下垂体由来）	ヒト血清（LH フリー）
系列３	NIBSC 1st IS 96/602（リコンビナント）	トリス緩衝液
系列４	NIBSC 1st IS 96/602（リコンビナント）	ヒト血清（LH フリー）

②共同実験結果（各社測定値の現状把握）

各社キットの測定方法に従い、プール血清検体２１種類（IVF 症例：９種類、産婦人科以外の症例：12 種類）を測定し、測定値比較および収束性を確認した。測定結果を以下に示す。

表1　測定結果

実検体	バイアルID（ラベル）	No.	A 結果 mIU/mL	B 結果 mIU/mL	C 結果 mIU/mL	D 結果 mIU/mL	E 結果 mIU/mL	F 結果 mIU/mL	G 結果 mIU/mL	H 結果 mIU/mL	J 結果 mIU/mL	K 結果 mIU/mL	L 結果 mIU/mL	M 結果 mIU/mL	平均 mIU/mL	CV %
IVF患者（1～10）	LH検体-1	1	3.03	1.5		2.12	1.66	2.2	2.07	1.72	2.44	2.0	1.77	1.93	2.04	20.8
	LH検体-2	2	6.10	3.6	2.59	4.69	3.92	4.8	4.64	3.96	4.81	4.7	3.65	4.66	4.34	20.1
	LH検体-3	3	8.00	7.2	14.84	10.1	6.94	8.1	7.04	6.18	7.3	6.4	5.47	6.86	7.87	31.5
	LH検体-4	4	18.19	12.7	14.56	15.4	14.0	16.4	15.75	12.42	16.82	15.3	12.71	15.41	14.97	11.9
	LH検体-5	5	13.57	9.2	10.64	11.5	10.7	13.4	12.33	9.57	12.08	11.8	9.18	11.94	11.32	13.2
	LH検体-6	6	17.24	11.5	13.85	14.5	15.7	19.8	15.17	12.95	16.39	14.5	12.47	15.05	14.92	15.0
	LH検体-7	7	26.04	17.4	24.91	20.4	24.7	23.5	23.71	21.91	25.5	23.6	18.97	22.23	22.74	11.7
	LH検体-8	8	29.39	18.5	26.44	23.8	29.6	32.4	26.67	25.11	28.38	24.1	22.73	24.95	26.01	14.2
	LH検体-9	9	44.45	32.6	45.99	22.1	41.8	46.6	41.73	35.95	45.98	42.3	32.09	39.71	39.27	18.7
	LH検体-10	10	72.67	55.1	81.65	47.4	69.8	77.5	72.24	66.69	72.11	70.2	59.51	68.64	67.80	14.1
産婦人科以外の患者（11～21）	LH検体-11	1	1.61	0.8		0.94	0.59	1.1	0.92	0.98	1.03	1.0	0.94	1.00	0.99	24.8
	LH検体-12	2	3.81	2.1		2.92	2.44	3.3	2.85	2.77	2.79	2.7	2.37	2.65	2.79	16.5
	LH検体-13	3	5.99	4.3	2.77	3.87	4.72	6.5	4.60	5.04	4.82	4.7	3.50	4.68	4.62	21.6
	LH検体-14	4	7.53	4.2	3.72	4.92	5.86	8.0	6.04	6.08	6.39	5.3	4.19	5.83	5.67	22.9
	LH検体-15	5	13.33	11.7	10.67	11.8	11.8	12.9	12.16	11.08	11.62	12.3	6.96	11.61	11.49	13.9
	LH検体-16	6	14.30	11.1	11.20	11.3	11.7	15.5	12.97	11.61	13.58	12.3	8.83	12.12	12.21	14.2
	LH検体-17	7	19.09	16.1	17.13	18.2	17.2	19.3	17.64	15.56	17.69	17.7	12.41	16.87	17.07	10.7
	LH検体-18	8	26.73	20.8	23.22	23.0	24.3	24.9	23.49	21.16	24.24	24.1	17.51	22.83	23.02	10.2
	LH検体-19	9	38.42	25.3	38.59	32.1	34.0	39.0	34.60	33.81	34.78	34.4	25.02	32.96	33.58	13.5
	LH検体-20	10	49.29	38.8	51.64	35.9	46.8	51.0	45.75	33.25	46.89	50.1	36.38	45.50	44.28	14.6
	LH検体-21	11	81.85	61.9	96.22	84.2	78.1	82.6	74.65	63.57	78.78	81.9	67.95	74.24	77.16	12.4
															平均CV	16.5

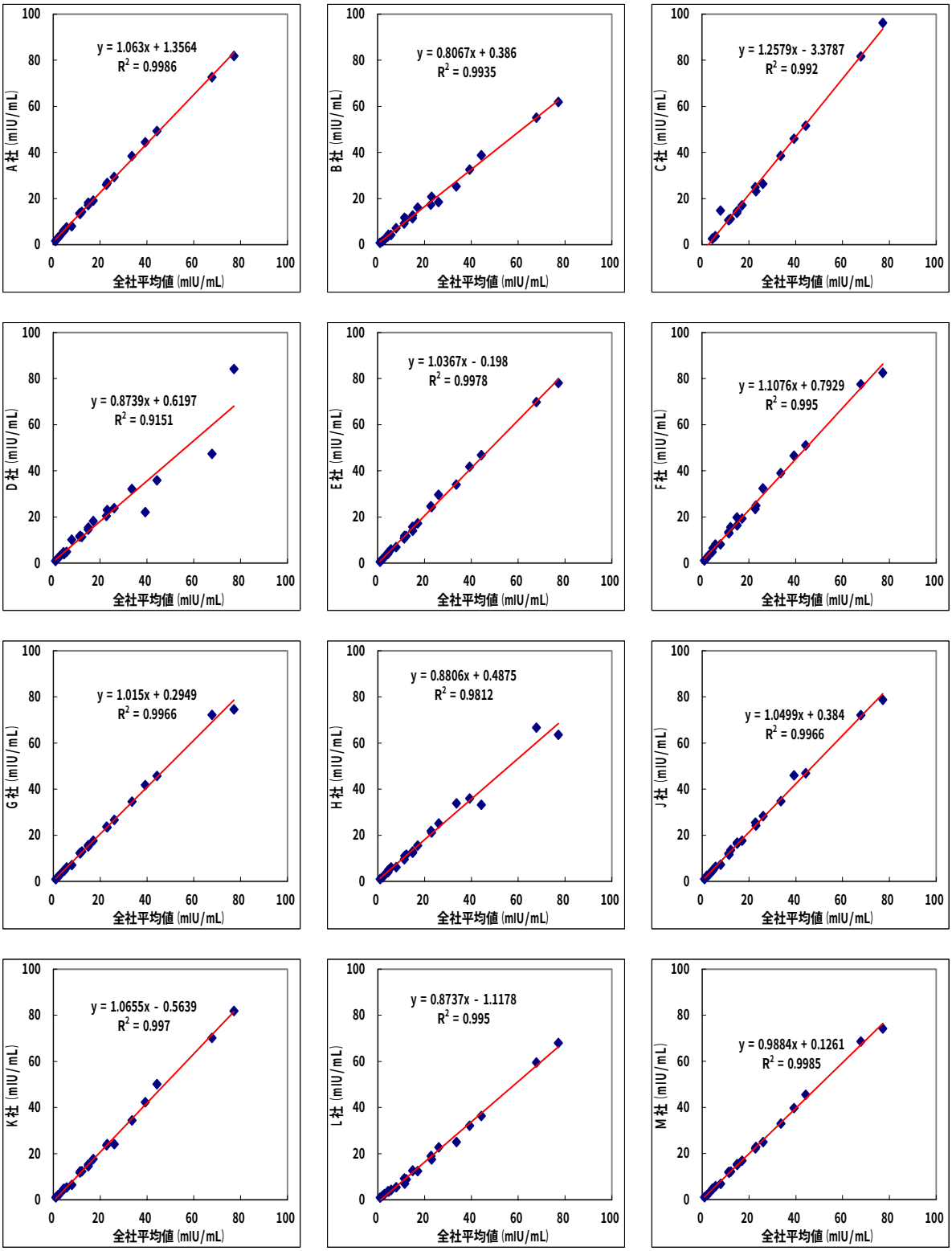
注記

		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	平均	CV
実検体の相関 全検体（1-21） X：全社平均　Y：各社	傾き	1.06	0.81	1.26	0.87	1.04	1.11	1.01	0.88	1.05	1.07	0.87	0.99	1.002	12.6
	切片	1.36	0.39	-3.38	0.62	-0.20	0.79	0.29	0.49	0.38	-0.56	-1.12	0.13		
	r2	0.999	0.993	0.992	0.915	0.998	0.995	0.997	0.981	0.997	0.997	0.995	0.998		
	r	0.999	0.997	0.996	0.957	0.999	0.997	0.998	0.991	0.998	0.999	0.998	0.999		

		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	平均	CV
実検体の相関 IVF患者（1～10） X：全社平均　Y：各社	傾き	1.07	0.81	1.21	0.63	1.05	1.16	1.07	0.99	1.09	1.05	0.88	1.01	1.001	16.0
	切片	1.32	-0.18	-2.09	3.96	-0.41	0.04	-0.47	-1.26	0.24	-0.65	-0.63	-0.24		
	r2	0.998	0.996	0.984	0.945	0.996	0.995	0.999	0.998	0.996	0.997	0.998	0.999		
	r	0.999	0.998	0.992	0.972	0.998	0.997	1.000	0.999	0.998	0.998	0.999	1.000		

		A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	平均	CV
実検体の相関 産婦人科以外の患者（11～21） X：全社平均　Y：各社	傾き	1.06	0.80	1.29	1.04	1.02	1.08	0.98	0.81	1.03	1.08	0.87	0.97	1.002	13.3
	切片	1.37	0.88	-4.49	-1.16	-0.10	1.23	0.71	1.52	0.33	-0.40	-1.57	0.34		
	r2	0.999	0.993	0.999	0.980	0.999	0.997	0.998	0.986	0.999	0.998	0.994	0.999		
	r	0.999	0.997	0.999	0.990	1.000	0.999	0.999	0.993	1.000	0.999	0.997	0.999		

図1 ： 実検体相関（全社平均値に対する相関）



全社平均測定値に対する各社測定値の相関は、傾き 0.81～1.26 となった。また、相関係数は１社を除き全て r=0.99 以上の良好な相関が認められた。ＩＶＦ患者と産婦人科以外の患者の差異に関しては、一部のキットで相関式の傾きが乖離しているように見られたが、検体数が少ないため明確なことはいえないと考えた。以後の解析においては、ＩＶＦ患者と産婦人科以外の患者の区別は行わない事とした。また、全検体、全キットにおける平均ＣＶは、16.5 %であった。また全社平均値に対する相関の傾きが 0.9～1.1 に入るキットは 6 キットであった。以上より、現在の国内ＬＨ測定においては、±20 %のキット間差があるものと推察される。

③共同実験結果（標準品候補の測定）

国内一次標準の設定に向け、数種の抗原およびベースを使用した標準試料を測定した。評価用標準品としては、WHO 2nd IS（80/552）、WHO1st IS（96/602）をそれぞれ緩衝液、または血清に溶解した計４種の標品を使用した。測定結果を以下に示す。

表2 ： 標品系列の測定結果

				コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
評価用標準品			バイアルID	理論濃度	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果
				(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)
系列(1)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	1	系1 LH 0	0	0.590	0.0	over	0.20	0.265	0.1	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00
		2	系1 LH 2	2	2.42	2.8	2.01	2.77	3.05	3.8	1.62	2.43	2.14	2.2	1.91	1.69
		3	系1 LH 5	5	5.77	8.2	5.43	6.21	7.33	9.1	4.12	6.08	5.21	5.4	5.54	4.24
		4	系1 LH 20	20	20.52	33.4	22.19	23.4	22.6	36.2	16.23	24.40	19.83	22.1	18.92	17.18
		5	系1 LH 50	50	50.18	79.3	59.13	65.4	62.2	89.0	37.86	60.02	53.28	56.8	54.94	45.24
		6	系1 LH 100	100	99.27	151.8	117.8	112	143.0	176.3	86.70	116.26	104.52	110.4	96.49	93.90
		7	系1 LH 200	200	199.9	over	over	247	over	over	145.31	234.13	214.27	226.4	over	over
系列(2)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) ヒト血清	1	系2 LH 0	0	0.505	0.0	over	0.12	0.526	0.3	0.00	0.00	0.01	0.0	0.00	0.00
		2	系2 LH 2	2	2.73	3.0	1.38	2.78	3.52	4.1	1.70	2.37	2.00	2.2	2.23	1.58
		3	系2 LH 5	5	5.82	7.5	4.74	6.26	9.94	9.6	3.54	5.75	4.73	5.2	5.09	4.17
		4	系2 LH 20	20	20.40	31.8	23.36	24.7	35.4	37.9	12.72	23.13	20.88	21.9	20.24	16.65
		5	系2 LH 50	50	48.75	77.4	61.9	60.4	90.4	87.7	33.94	53.92	55.10	55.2	53.78	43.69
		6	系2 LH 100	100	94.68	153.9	129.9	121	over	177.3	69.08	109.40	102.80	107.8	over	89.33
		7	系2 LH 200	200	188.6	over	over	256	over	over	163.28	234.14	204.36	219.2	over	over
系列(3)	1st IS (96/602) (リコンビナント) 緩衝液	1	系3 LH 0	0	0.599	0.0	over	0.22	0.277	0.1	0.00	0.00	0.01	0.0	0.00	0.00
		2	系3 LH 2	2	1.69	0.7	1.13	1.54	0.906	0.9	0.61	0.87	0.96	0.9	0.62	0.92
		3	系3 LH 5	5	3.50	1.6	2.47	3.47	1.83	2.3	1.60	2.41	2.54	2.3	1.93	2.42
		4	系3 LH 20	20	10.79	8.6	9.93	11.9	5.88	8.5	7.37	8.29	9.45	8.3	6.80	9.36
		5	系3 LH 50	50	27.45	21.8	29.26	30.7	18.9	22.0	14.08	20.43	26.83	23.9	20.88	25.43
		6	系3 LH 100	100	48.86	40.7	53.48	56.4	42.7	40.0	33.52	38.30	46.23	45.2	43.25	46.55
		7	系3 LH 200	200	95.19	78.8	109.8	115	113.0	79.4	69.65	79.14	100.65	87.9	89.48	95.14
系列(4)	1st IS (96/602) (リコンビナント) ヒト血清	1	系4 LH 0	0	0.516	0.0	over	0.03	0.480	0.3	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00
		2	系4 LH 2	2	1.63	0.8	over	1.35	0.936	1.1	0.81	0.81	0.97	0.9	0.83	0.89
		3	系4 LH 5	5	3.19	1.8	1.71	3.18	2.84	2.3	2.00	1.91	2.16	2.2	2.01	2.13
		4	系4 LH 20	20	10.32	7.0	10.17	11.8	5.11	8.4	7.21	7.16	9.14	8.3	7.77	8.92
		5	系4 LH 50	50	24.36	19.4	28.13	29.0	19.4	20.5	17.82	19.50	24.07	21.6	20.24	22.07
		6	系4 LH 100	100	47.41	33.2	60.18	57.9	33.0	39.4	35.04	36.63	45.97	43.9	42.02	44.14
		7	系4 LH 200	200	90.02	71.8	120.4	115	83.1	77.9	66.47	71.89	98.10	86.0	90.42	88.17

レンジオーバー
数値変更：レンジオーバー表記を0に変更

				平均	SD	CV	系列ごと平均CV
評価用標準品			バイアルID			%	%
系列(1)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	1	系1 LH 0	0.11	0.19		23.4
		2	系1 LH 2	2.41	0.63	26.3	
		3	系1 LH 5	6.05	1.49	24.6	
		4	系1 LH 20	23.08	6.02	26.1	
		5	系1 LH 50	59.45	13.92	23.4	
		6	系1 LH 100	117.37	26.66	22.7	
		7	系1 LH 200	211.17	36.10	17.1	
系列(2)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) ヒト血清	1	系2 LH 0	0.13	0.21		28.1
		2	系2 LH 2	2.46	0.80	32.5	
		3	系2 LH 5	6.03	2.02	33.5	
		4	系2 LH 20	24.09	7.43	30.9	
		5	系2 LH 50	60.18	17.04	28.3	
		6	系2 LH 100	115.52	31.74	27.5	
		7	系2 LH 200	210.93	33.02	15.7	
系列(3)	1st IS (96/602) (リコンビナント) 緩衝液	1	系3 LH 0	0.11	0.19		21.6
		2	系3 LH 2	0.98	0.33	34.0	
		3	系3 LH 5	2.36	0.62	26.2	
		4	系3 LH 20	8.76	1.67	19.1	
		5	系3 LH 50	23.47	4.74	20.2	
		6	系3 LH 100	44.60	6.38	14.3	
		7	系3 LH 200	92.76	14.76	15.9	
系列(4)	1st IS (96/602) (リコンビナント) ヒト血清	1	系4 LH 0	0.12	0.20		20.8
		2	系4 LH 2	1.00	0.26	26.4	
		3	系4 LH 5	2.29	0.51	22.2	
		4	系4 LH 20	8.44	1.79	21.2	
		5	系4 LH 50	22.17	3.55	16.0	
		6	系4 LH 100	43.23	8.85	20.5	
		7	系4 LH 200	88.27	16.53	18.7	

表3 ： 標品系列の理論値比

				コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
評価用標準品			バイアルID	理論濃度	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値	対理論値
				(mIU/mL)	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
系列1	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	1	系1 LH 0	0												
		2	系1 LH 2	2	121.0	140.0	100.5	138.5	152.5	191.8	81.1	121.5	107.0	110.0	95.5	84.5
		3	系1 LH 5	5	115.4	164.0	108.5	124.2	146.6	181.6	82.3	121.6	104.2	108.0	110.8	84.8
		4	系1 LH 20	20	102.6	167.0	110.9	117.0	113.0	181.0	81.1	122.0	99.2	110.5	94.6	85.9
		5	系1 LH 50	50	100.4	158.6	118.3	130.8	124.4	178.0	75.7	120.0	106.6	113.6	109.9	90.5
		6	系1 LH 100	100	99.3	151.8	117.8	112.0	143.0	176.3	86.7	116.3	104.5	110.4	96.5	93.9
		7	系1 LH 200	200	100.0			123.5			72.7	117.1	107.1	113.2		
系列2	2nd IS (80/552) (下垂体由来) ヒト血清	1	系2 LH 0	0												
		2	系2 LH 2	2	136.5	150.0	69.0	139.0	176.0	203.7	84.8	118.5	100.0	110.0	111.5	79.0
		3	系2 LH 5	5	116.4	150.0	94.8	125.2	198.8	191.7	70.7	115.0	94.6	104.0	101.8	83.4
		4	系2 LH 20	20	102.0	159.0	116.8	123.5	177.0	189.5	63.6	115.7	104.4	109.5	101.2	83.3
		5	系2 LH 50	50	97.5	154.8	123.8	120.8	180.8	175.4	67.9	107.8	110.2	110.4	107.6	87.4
		6	系2 LH 100	100	94.7	153.9	129.9	121.0		177.3	69.1	109.4	102.8	107.8		89.3
		7	系2 LH 200	200	94.3			128.0			81.6	117.1	102.2	109.6		
系列3	1st IS (96/602) (リコンビナント) 緩衝液	1	系3 LH 0	0												
		2	系3 LH 2	2	84.5	35.0	56.5	77.0	45.3	45.2	30.3	43.5	48.0	45.0	31.0	46.0
		3	系3 LH 5	5	70.0	32.0	49.4	69.4	36.6	45.4	32.0	48.2	50.8	46.0	38.6	48.4
		4	系3 LH 20	20	54.0	43.0	49.7	59.5	29.4	42.3	36.9	41.5	47.3	41.5	34.0	46.8
		5	系3 LH 50	50	54.9	43.6	58.5	61.4	37.8	44.0	28.2	40.9	53.7	47.8	41.8	50.9
		6	系3 LH 100	100	48.9	40.7	53.5	56.4	42.7	40.0	33.5	38.3	46.2	45.2	43.3	46.6
		7	系3 LH 200	200	47.6	39.4	54.9	57.5	56.5	39.7	34.8	39.6	50.3	44.0	44.7	47.6
系列4	1st IS (96/602) (リコンビナント) ヒト血清	1	系4 LH 0	0												
		2	系4 LH 2	2	81.5	40.0		67.5	46.8	54.2	40.3	40.5	48.5	45.0	41.5	44.5
		3	系4 LH 5	5	63.8	36.0	34.2	63.6	56.8	46.1	39.9	38.2	43.2	44.0	40.2	42.6
		4	系4 LH 20	20	51.6	35.0	50.9	59.0	25.6	42.0	36.0	35.8	45.7	41.5	38.9	44.6
		5	系4 LH 50	50	48.7	38.8	56.3	58.0	38.8	40.9	35.6	39.0	48.1	43.2	40.5	44.1
		6	系4 LH 100	100	47.4	33.2	60.2	57.9	33.0	39.4	35.0	36.6	46.0	43.9	42.0	44.1
		7	系4 LH 200	200	45.0	35.9	60.2	57.5	41.6	39.0	33.2	35.9	49.1	43.0	45.2	44.1

空白:レンジオーバー

図2 ： 標品系列の理論値比

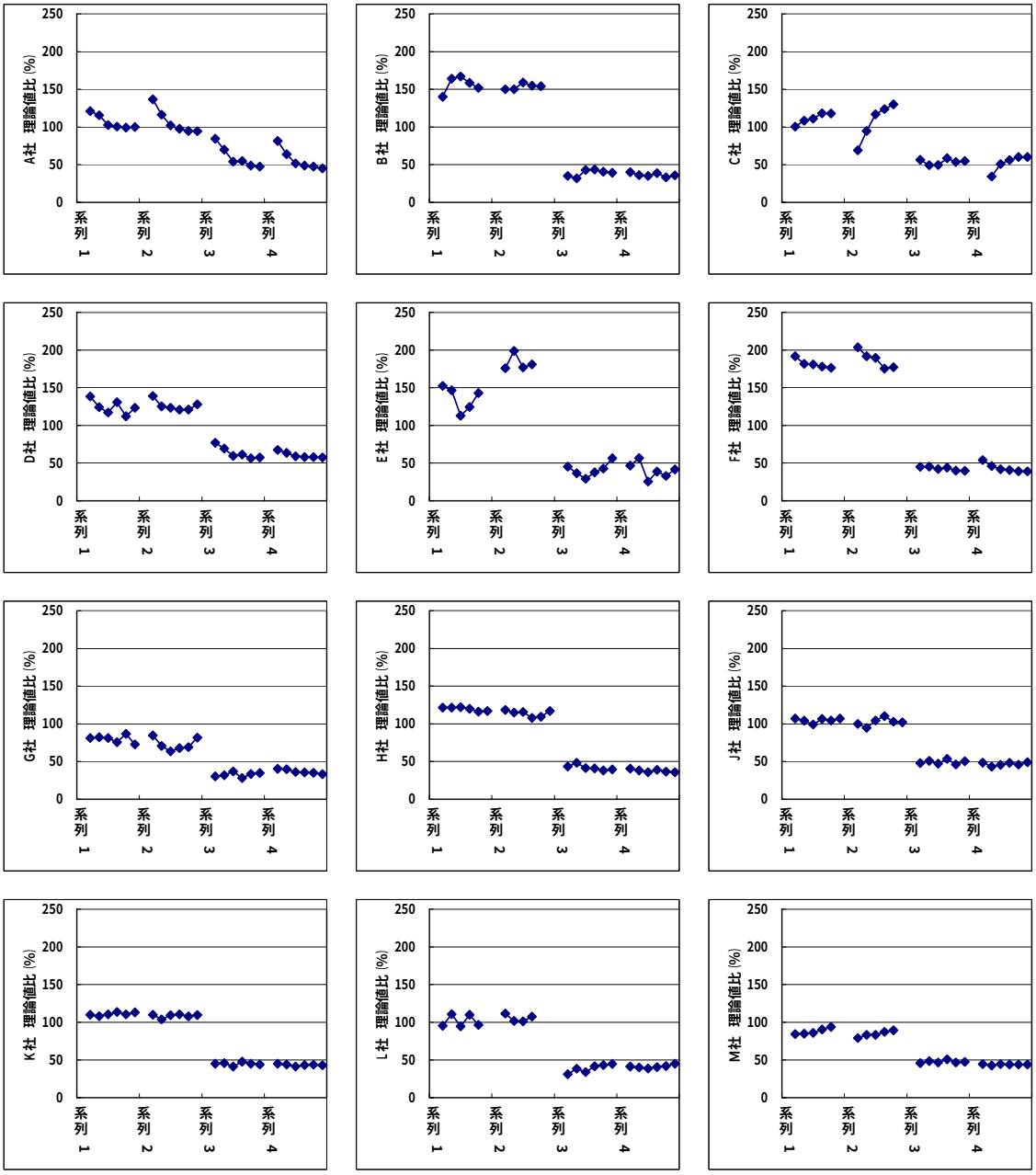


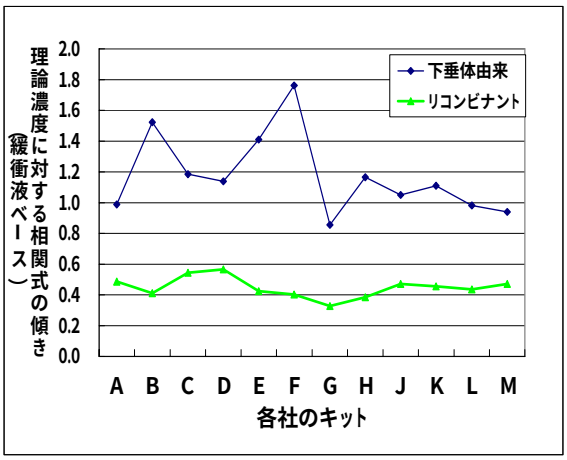
表4 ：表品系列の理論値に対する相関性

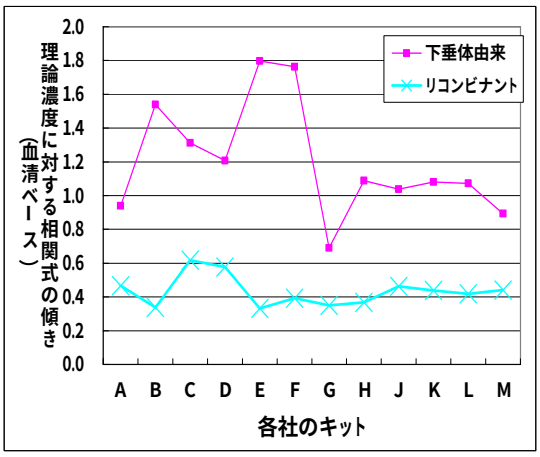
1、緩衝液ベース

			コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	平均	SD	CV(%)
系列（1）	2nd IS (80/552)	緩衝液	下垂体由来	0.99	1.52	1.19	1.14	1.41	1.76	0.85	1.16	1.05	1.11	0.98	0.94	1.18	0.27	22.6
系列（3）	1st IS (96/602)	緩衝液	ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ	0.49	0.41	0.54	0.57	0.42	0.40	0.33	0.38	0.47	0.46	0.43	0.47	0.45	0.07	14.8
			平均	0.74	0.97	0.86	0.85	0.92	1.08	0.59	0.77	0.76	0.78	0.71	0.70			
			SD	0.35	0.78	0.45	0.41	0.70	0.96	0.37	0.55	0.41	0.46	0.39	0.33			
			CV (%)	47.95	81.16	52.61	47.59	76.11	88.77	63.05	71.35	53.78	58.96	54.61	46.92			
			MAX	0.99	1.52	1.19	1.14	1.41	1.76	0.85	1.16	1.05	1.11	0.98	0.94			
			MIN	0.49	0.41	0.54	0.57	0.42	0.40	0.33	0.38	0.47	0.46	0.43	0.47			
			MAX対平均%	34%	57%	37%	34%	54%	63%	45%	50%	38%	42%	39%	33%			
			MIN対平均%	-34%	-57%	-37%	-34%	-54%	-63%	-45%	-50%	-38%	-42%	-39%	-33%			
			RANGE%	67.8%	114.8%	74.4%	67.3%	107.6%	125.5%	89.2%	100.9%	76.1%	83.4%	77.2%	66.4%			

2、血清ベース

			コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	平均	SD	CV(%)
系列（2）	2nd IS (80/552)	血清	下垂体由来	0.94	1.54	1.31	1.21	1.80	1.76	0.69	1.09	1.04	1.08	1.07	0.89	1.20	0.34	28.5
系列（4）	1st IS (96/602)	血清	ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ	0.47	0.34	0.62	0.58	0.33	0.39	0.35	0.37	0.46	0.44	0.42	0.44	0.43	0.09	20.7
			平均	0.70	0.94	0.96	0.89	1.06	1.08	0.52	0.73	0.75	0.76	0.75	0.67			
			SD	0.33	0.85	0.49	0.45	1.04	0.97	0.24	0.51	0.41	0.45	0.46	0.32			
			CV (%)	47.46	90.50	50.94	49.91	97.20	89.96	46.19	69.81	54.24	59.82	61.97	47.91			
			MAX	0.94	1.54	1.31	1.21	1.80	1.76	0.69	1.09	1.04	1.08	1.07	0.89			
			MIN	0.47	0.34	0.62	0.58	0.33	0.39	0.35	0.37	0.46	0.44	0.42	0.44			
			MAX対平均%	34%	64%	36%	35%	69%	64%	33%	49%	38%	42%	44%	34%			
			MIN対平均%	-34%	-64%	-36%	-35%	-69%	-64%	-33%	-49%	-38%	-42%	-44%	-34%			
			RANGE%	67.1%	128.0%	72.0%	70.6%	137.5%	127.2%	65.3%	98.7%	76.7%	84.6%	87.6%	67.8%			





キット間差を CV %で確認すると、CV20～30 %の差が確認された。標準品の差としてはWHO1st IS（96/602）（リコンビナント）の方が、WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）よりもわずかに収束が良いと思われた。

理論濃度に対する割合については、各キット共、系列間の変動が確認された。系列３，４（WHO1st IS（96/602）（リコンビナント））は下垂体由来抗原を用いた系列１，２より低い値を示していた。今回の結果のみで断定することはできないが、WHO1st IS（96/602）（リコンビナント）の表示値を伝達しているとはいえない状況である。この点については、追試による確認が必要と考えられる。

一方、WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）は、キット間差が大きい点が示された。

理論濃度に対する相関式の傾きの数値は系列１で 1.76～0.85、系列２で 1.80～0.69、系列３で 0.57～0.33、系列４で 0.62～0.33 と各キットで大きくばらついた。系列毎の差を見ると、系列１、２、４ではキット間差は CV２０%を越えているが、系列３は CV15 %と４系列の中では比較的収束していた。標準品各系列について各キット毎の傾向を見てみると、系列１と２は各キット毎に傾向が類似していた。同様に系列３と４も各キット毎に傾向が類似していたが、系列１，２と系列３，４を比較すると大きな差が見られた。抗原の由来（系列１，２は下垂体由来、系列３，４はリコンビナント）によるものと考えられる。今回の検討の中で最もキット間差が少ないのは、「リコンビナント抗原＋緩衝液ベース（系列３）」であった。

ベースによる差については、両者の相関式の傾きの比を取って評価した。下垂体由来抗原、リコンビナント抗原とも多くのキットが、緩衝液ベースと血清ベースの比の値が 0.9～1.1 に収まっていた。一部のキットで緩衝液／血清の比が 1.2（或いは 0.8）を越える場合が見られているが、一定の傾向は無く、全体としてはベースによる影響は少ないものと考えられた。

④共同実験結果（標準品候補による実検体測定値の校正）

標準品候補の測定結果を用いて実検体測定結果を校正し、キット間差の是正を試みた。校正の方法は、次の通りである。

（１）補正係数算出

評価用標準品の測定結果より実検体測定値の補正係数を算出した。

（２）実検体測定値の校正

得られた補正係数により、実検体測定値に対する補正を行った。

（３）校正前後の比較

校正前後のキット間差の変化をＣＶ %値で表示するとともに、各キットの補正前後における相関式（対全社平均値）の傾きを比較した。

表6 ： 補正係数の算出

補正係数の算出法
他WGで採用している下記の方法とした。
各施設の報告値　X1，X2，X3
各試料の目標値　S1，S2，S3 としたとき
目標値への補正係数 F＝(S1*2＋S2*2+S3*2)／(X1S1＋X2S2＋X3S3)
(X=AYの相関を取ったときのAと考えて良い。)

(1) 系列1　2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液ベースによる補正係数算出

評価用標準品			コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
			バイアルID (ラベル)	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果
			理論濃度 mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL
系列 (1)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	1	系1 LH 0	0	0.590	0.0		0.20	0.265	0.1	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00
		2	系1 LH 2	2	2.42	2.8	2.01	2.77	3.05	3.8	1.62	2.43	2.14	2.2	1.91	1.69
		3	系1 LH 5	5	5.77	8.2	5.43	6.21	7.33	9.1	4.12	6.08	5.21	5.4	5.54	4.24
		4	系1 LH 20	20	20.52	33.4	22.19	23.4	22.6	36.2	16.23	24.40	19.83	22.1	18.92	17.18
		5	系1 LH 50	50	50.18	79.3	59.13	65.4	62.2	89.0	37.86	60.02	53.28	56.8	54.94	45.24
		6	系1 LH 100	100	99.27	151.8	117.8	112	143.0	176.3	86.70	116.26	104.52	110.4	96.49	93.90
		7	系1 LH 200	200	199.9			247			145.31	234.13	214.27	226.4		
系列(1)の相関式 レベル1～6				傾き	0.99	1.52	1.19	1.14	1.41	1.76	0.85	1.16	1.05	1.11	0.98	0.94
X:理論濃度 Y:測定値				Y切片	0.68	1.01	-0.66	1.39	-1.87	0.45	-0.80	0.50	-0.12	0.11	0.69	-0.65
補正係数F (レベル1～6)					1.00	0.65	0.85	0.86	0.72	0.57	1.18	0.85	0.95	0.90	1.01	1.08
補正係数の逆数 1／F					1.00	1.54	1.18	1.16	1.38	1.77	0.84	1.17	1.05	1.11	0.99	0.93

(2) 系列2　2nd IS (80/552) (下垂体由来) ヒト血清ベースによる補正係数算出

評価用標準品			コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
			バイアルID (ラベル)	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果
			理論濃度 mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL
系列 (2)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) ヒト血清	1	系2 LH 0	0	0.505	0.0		0.12	0.526	0.3	0.00	0.00	0.01	0.0	0.00	0.00
		2	系2 LH 2	2	2.73	3.0	1.38	2.78	3.52	4.1	1.70	2.37	2.00	2.2	2.23	1.58
		3	系2 LH 5	5	5.82	7.5	4.74	6.26	9.94	9.6	3.54	5.75	4.73	5.2	5.09	4.17
		4	系2 LH 20	20	20.40	31.8	23.36	24.7	35.4	37.9	12.72	23.13	20.88	21.9	20.24	16.65
		5	系2 LH 50	50	48.75	77.4	61.9	60.4	90.4	87.7	33.94	53.92	55.10	55.2	53.78	43.69
		6	系2 LH 100	100	94.68	153.9	129.9	121		177.3	69.08	109.40	102.80	107.8		89.33
		7	系2 LH 200	200	188.6			256			163.28	234.14	204.36	219.2		
系列(2)の相関式 レベル1～6				傾き	0.94	1.54	1.31	1.21	1.80	1.76	0.69	1.09	1.04	1.08	1.07	0.89
X:理論濃度 Y:測定値				Y切片	1.07	0.17	-2.21	0.28	0.29	0.81	-0.17	0.31	0.27	0.15	-0.26	-0.47
補正係数F (レベル1～6)					1.05	0.65	0.78	0.83	0.55	0.56	1.46	0.91	0.96	0.92	0.94	1.13
補正係数の逆数 1／F					0.96	1.54	1.28	1.21	1.80	1.77	0.69	1.09	1.04	1.08	1.07	0.89

(3) 系列3　1st IS (96/602) (リコンビナント) 緩衝液ベースによる補正係数算出

評価用標準品			コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
			バイアルID (ラベル)	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果
			理論濃度 mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL
系列 (3)	1st IS (96/602) (リコンビナント) 緩衝液	1	系3 LH 0	0	0.599	0.0		0.22	0.277	0.1	0.00	0.00	0.01	0.0	0.00	0.00
		2	系3 LH 2	2	1.69	0.7	1.13	1.54	0.906	0.9	0.61	0.87	0.96	0.9	0.62	0.92
		3	系3 LH 5	5	3.50	1.6	2.47	3.47	1.83	2.3	1.60	2.41	2.54	2.3	1.93	2.42
		4	系3 LH 20	20	10.79	8.6	9.93	11.9	5.88	8.5	7.37	8.29	9.45	8.3	6.80	9.36
		5	系3 LH 50	50	27.45	21.8	29.26	30.7	18.9	22.0	14.08	20.43	26.83	23.9	20.88	25.43
		6	系3 LH 100	100	48.86	40.7	53.48	56.4	42.7	40.0	33.52	38.30	46.23	45.2	43.25	46.55
		7	系3 LH 200	200	95.19	78.8	109.8	115	113.0	79.4	69.65	79.14	100.65	87.9	89.48	95.14
系列(3)の相関式 レベル1～6				傾き	0.49	0.41	0.54	0.57	0.42	0.40	0.33	0.38	0.47	0.46	0.43	0.47
X:理論濃度 Y:測定値				Y切片	1.11	0.08	0.04	0.69	-0.74	0.40	-0.14	0.40	0.44	-0.03	-0.57	0.22
補正係数F (レベル1～7)					2.07	2.51	1.83	1.74	1.89	2.50	2.92	2.54	2.01	2.25	2.26	2.10
補正係数の逆数 1／F					0.48	0.40	0.55	0.57	0.53	0.40	0.34	0.39	0.50	0.44	0.44	0.48

(4) 系列4　1st IS (96/602) (リコンビナント) ヒト血清ベースによる補正係数算出

評価用標準品			コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
			バイアルID (ラベル)	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果
			理論濃度 mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL
系列 (4)	1st IS (96/602) (リコンビナント) ヒト血清	1	系4 LH 0	0	0.516	0.0		0.03	0.480	0.3	0.00	0.00	0.00	0.0	0.00	0.00
		2	系4 LH 2	2	1.63	0.8		1.35	0.936	1.1	0.81	0.81	0.97	0.9	0.83	0.89
		3	系4 LH 5	5	3.19	1.8	1.71	3.18	2.84	2.3	2.00	1.91	2.16	2.2	2.01	2.13
		4	系4 LH 20	20	10.32	7.0	10.17	11.8	5.11	8.4	7.21	7.16	9.14	8.3	7.77	8.92
		5	系4 LH 50	50	24.36	19.4	28.13	29.0	19.4	20.5	17.82	19.50	24.07	21.6	20.24	22.07
		6	系4 LH 100	100	47.41	33.2	60.18	57.9	33.0	39.4	35.04	36.63	45.97	43.9	42.02	44.14
		7	系4 LH 200	200	90.02	71.8	120.4	115	83.1	77.9	66.47	71.89	98.10	86.0	90.42	88.17
系列(4)の相関式 レベル1～6				傾き	0.47	0.34	0.62	0.58	0.33	0.39	0.35	0.37	0.46	0.44	0.42	0.44
X:理論濃度 Y:測定値				Y切片	0.77	0.39	-1.96	0.18	0.47	0.42	0.16	0.11	0.06	-0.12	-0.22	0.00
補正係数F (レベル1～7)					2.19	2.82	1.67	1.74	2.52	2.55	2.97	2.76	2.07	2.32	2.26	2.27
補正係数の逆数 1／F					0.46	0.36	0.60	0.58	0.40	0.39	0.34	0.36	0.48	0.43	0.44	0.44

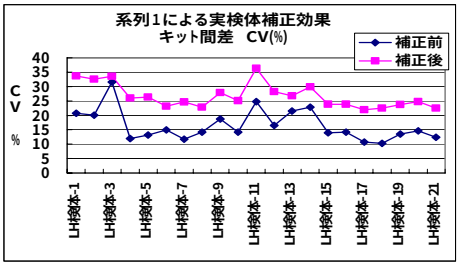
系列１（WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）緩衝液ベース）による校正結果を以下に示す。キット間差の CV は、CV16.5 %から CV26.6 %へ拡大した。キット間差の傾向を見ると、校正によりで全社平均値に近づいたキットは殆どなく、また幾つかのキットでは全社平均から更に離れる方向に動いている。

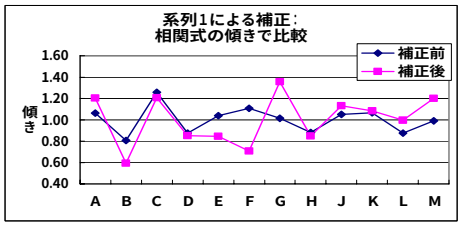
表6 ： 系列1での較正結果

			A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
系列1による補正前	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.06	0.81	1.26	0.87	1.04	1.11	1.01	0.88	1.05	1.07	0.87	0.99
		切片	1.36	0.39	-3.38	0.62	-0.20	0.79	0.29	0.49	0.38	-0.56	-1.12	0.13
		r2	0.999	0.993	0.992	0.915	0.998	0.995	0.997	0.981	0.997	0.997	0.995	0.998
		r	0.999	0.997	0.996	0.957	0.999	0.997	0.998	0.991	0.998	0.999	0.998	0.999
系列1による補正後	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.20	0.59	1.21	0.85	0.84	0.71	1.36	0.85	1.13	1.08	1.00	1.20
		切片	1.37	0.26	-2.85	0.54	-0.14	0.45	0.36	0.42	0.37	-0.50	-1.12	0.14
		r2	0.999	0.993	0.992	0.915	0.998	0.995	0.997	0.981	0.997	0.997	0.995	0.999
		r	0.999	0.997	0.996	0.956	0.999	0.997	0.998	0.991	0.998	0.999	0.998	0.999

系列1 補正前後比較

実検体	バイアルID（ラベル）	No.	系列1による補正前 平均	SD	CV (%)	系列1による補正後 平均	SD	CV (%)
IVF患者（1～10）	LH検体-1	1	2.04	0.42	20.8	1.83	0.62	33.6
	LH検体-2	2	4.34	0.87	20.1	3.89	1.26	32.5
	LH検体-3	3	7.87	2.48	31.5	6.91	2.32	33.6
	LH検体-4	4	14.97	1.78	11.9	13.34	3.47	26.0
	LH検体-5	5	11.32	1.49	13.2	10.08	2.65	26.3
	LH検体-6	6	14.92	2.23	15.0	13.18	3.05	23.1
	LH検体-7	7	22.74	2.67	11.7	20.24	4.98	24.6
	LH検体-8	8	26.01	3.68	14.2	22.99	5.25	22.8
	LH検体-9	9	39.27	7.35	18.7	34.81	9.69	27.8
	LH検体-10	10	67.80	9.57	14.1	60.16	15.07	25.1
産婦人科以外の患者（11～21）	LH検体-11	1	0.99	0.25	24.8	0.89	0.32	36.4
	LH検体-12	2	2.79	0.46	16.5	2.49	0.70	28.2
	LH検体-13	3	4.62	1.00	21.6	4.06	1.09	26.7
	LH検体-14	4	5.67	1.30	22.9	5.01	1.50	29.8
	LH検体-15	5	11.49	1.60	13.9	10.14	2.42	23.9
	LH検体-16	6	12.21	1.73	14.2	10.78	2.57	23.9
	LH検体-17	7	17.07	1.82	10.7	15.08	3.30	21.9
	LH検体-18	8	23.02	2.35	10.2	20.38	4.59	22.5
	LH検体-19	9	33.58	4.53	13.5	29.74	7.05	23.7
	LH検体-20	10	44.28	6.47	14.6	39.20	9.70	24.7
	LH検体-21	11	77.16	9.57	12.4	68.35	15.38	22.5
			平均CV (%)		16.5	平均CV (%)		26.6





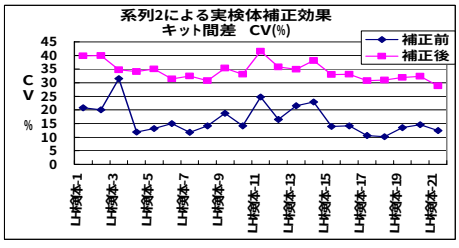
系列２（WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）血清ベース）による校正結果を以下に示す。キット間差のＣＶは、ＣＶ16.5 %からＣＶ34.2 %へ拡大した。傾向は系列１と同じである。

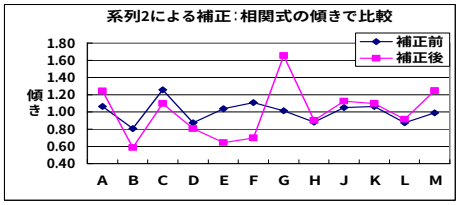
表7 ： 系列2での較正結果

			A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
系列2による補正前	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.06	0.81	1.26	0.87	1.04	1.11	1.01	0.88	1.05	1.07	0.87	0.99
		切片	1.36	0.39	-3.38	0.62	-0.20	0.79	0.29	0.49	0.38	-0.56	-1.12	0.13
		r2	0.999	0.993	0.992	0.915	0.998	0.995	0.997	0.981	0.997	0.997	0.995	0.998
		r	0.999	0.997	0.996	0.957	0.999	0.997	0.998	0.991	0.998	0.999	0.998	0.999
系列2による補正後	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.25	0.59	1.10	0.81	0.64	0.70	1.65	0.90	1.13	1.10	0.92	1.25
		切片	1.38	0.23	-2.66	0.50	-0.13	0.42	0.37	0.41	0.33	-0.56	-1.08	0.10
		r2	0.999	0.993	0.992	0.913	0.998	0.995	0.997	0.982	0.997	0.997	0.995	0.999
		r	0.999	0.997	0.996	0.956	0.999	0.998	0.999	0.991	0.998	0.999	0.997	0.999

系列2 補正前後比較

実検体	バイアルID（ラベル）	No.	系列2による補正前 平均	SD	CV (%)	系列2による補正後 平均	SD	CV (%)
IVF患者（1～10）	LH検体-1	1	2.04	0.42	20.8	1.88	0.75	39.9
	LH検体-2	2	4.34	0.87	20.1	3.96	1.58	40.0
	LH検体-3	3	7.87	2.48	31.5	6.92	2.40	34.7
	LH検体-4	4	14.97	1.78	11.9	13.51	4.60	34.1
	LH検体-5	5	11.32	1.49	13.2	10.22	3.58	35.0
	LH検体-6	6	14.92	2.23	15.0	13.32	4.17	31.3
	LH検体-7	7	22.74	2.67	11.7	20.45	6.65	32.5
	LH検体-8	8	26.01	3.68	14.2	23.20	7.15	30.8
	LH検体-9	9	39.27	7.35	18.7	35.24	12.46	35.4
	LH検体-10	10	67.80	9.57	14.1	60.86	20.17	33.1
産婦人科以外の患者（11～21）	LH検体-11	1	0.99	0.25	24.8	0.92	0.38	41.5
	LH検体-12	2	2.79	0.46	16.5	2.55	0.91	35.8
	LH検体-13	3	4.62	1.00	21.6	4.13	1.44	34.9
	LH検体-14	4	5.67	1.30	22.9	5.10	1.94	38.1
	LH検体-15	5	11.49	1.60	13.9	10.28	3.40	33.1
	LH検体-16	6	12.21	1.73	14.2	10.94	3.63	33.1
	LH検体-17	7	17.07	1.82	10.7	15.26	4.69	30.7
	LH検体-18	8	23.02	2.35	10.2	20.61	6.38	31.0
	LH検体-19	9	33.58	4.53	13.5	30.09	9.60	31.9
	LH検体-20	10	44.28	6.47	14.6	39.59	12.82	32.4
	LH検体-21	11	77.16	9.57	12.4	68.80	19.85	28.9
			平均CV (%)		16.5	平均CV (%)		34.2





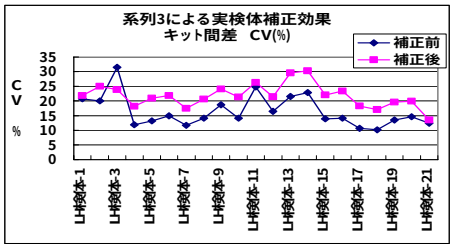
系列３（WHO1st IS（96/602）（リコンビナント）緩衝液ベースによる校正結果を以下に示す。キット間差の CV は、CV16.5 %から CV21.8 %へ拡大した。一部のキットでは校正効果が伺われるが、乖離が広がるキットも見られた。

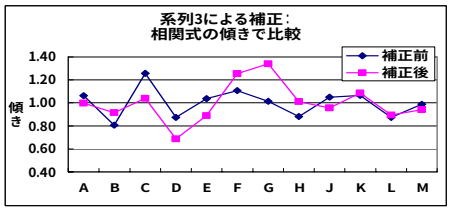
表8 ： 系列3での較正結果

			A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
系列3による補正前	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.06	0.81	1.26	0.87	1.04	1.11	1.01	0.88	1.05	1.07	0.87	0.99
		切片	1.36	0.39	-3.38	0.62	-0.20	0.79	0.29	0.49	0.38	-0.56	-1.12	0.13
		r2	0.999	0.993	0.992	0.915	0.998	0.995	0.997	0.981	0.997	0.997	0.995	0.998
		r	0.999	0.997	0.996	0.957	0.999	0.997	0.998	0.991	0.998	0.999	0.998	0.999
系列3による補正後	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.00	0.92	1.04	0.69	0.89	1.25	1.34	1.01	0.96	1.09	0.89	0.94
		切片	2.70	0.87	-6.28	1.07	-0.48	1.82	0.69	1.09	0.65	-1.39	-2.62	0.15
		r2	0.999	0.994	0.991	0.911	0.998	0.996	0.997	0.983	0.997	0.997	0.995	0.999
		r	0.999	0.997	0.996	0.955	0.999	0.998	0.999	0.991	0.999	0.998	0.997	0.999

系列3 補正前後比較

実検体	バイアルID（ラベル）	No.	系列3による補正前 平均	SD	CV (%)	系列3による補正後 平均	SD	CV (%)
IVF患者（1～10）	LH検体-1	1	2.04	0.42	20.8	4.56	1.00	21.9
	LH検体-2	2	4.34	0.87	20.1	9.65	2.41	25.0
	LH検体-3	3	7.87	2.48	31.5	17.07	4.08	23.9
	LH検体-4	4	14.97	1.78	11.9	33.11	6.03	18.2
	LH検体-5	5	11.32	1.49	13.2	25.11	5.26	21.0
	LH検体-6	6	14.92	2.23	15.0	33.08	7.24	21.9
	LH検体-7	7	22.74	2.67	11.7	50.26	8.77	17.5
	LH検体-8	8	26.01	3.68	14.2	57.58	11.90	20.7
	LH検体-9	9	39.27	7.35	18.7	87.41	21.10	24.1
	LH検体-10	10	67.80	9.57	14.1	150.74	32.15	21.3
産婦人科以外の患者（11～21）	LH検体-11	1	0.99	0.25	24.8	2.23	0.59	26.3
	LH検体-12	2	2.79	0.46	16.5	6.28	1.35	21.5
	LH検体-13	3	4.62	1.00	21.6	10.37	3.07	29.6
	LH検体-14	4	5.67	1.30	22.9	12.68	3.85	30.4
	LH検体-15	5	11.49	1.60	13.9	25.54	5.63	22.0
	LH検体-16	6	12.21	1.73	14.2	27.20	6.35	23.4
	LH検体-17	7	17.07	1.82	10.7	37.81	6.91	18.3
	LH検体-18	8	23.02	2.35	10.2	50.94	8.72	17.1
	LH検体-19	9	33.58	4.53	13.5	74.30	14.63	19.7
	LH検体-20	10	44.28	6.47	14.6	97.97	19.53	19.9
	LH検体-21	11	77.16	9.57	12.4	169.47	22.93	13.5
			平均CV (%)		16.5	平均CV (%)		21.8





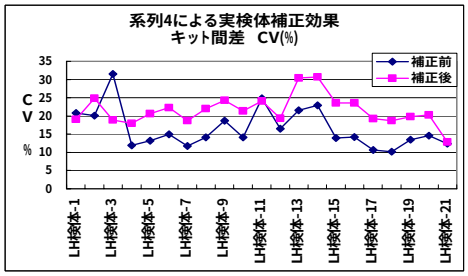
系列４（WHO1st IS（96/602）（リコンビナント）血清ベース）による校正結果を以下に示す。キット間差のＣＶは、ＣＶ16.5 %からＣＶ21.5 %へ拡大した。傾向は、系列３とほぼ同様である。

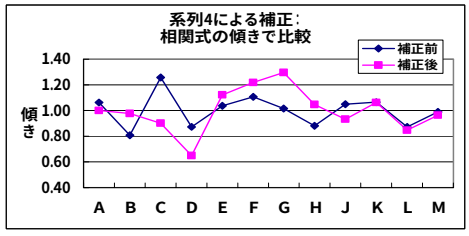
表9 ： 系列4での較正結果

			A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
系列4による補正前	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.06	0.81	1.26	0.87	1.04	1.11	1.01	0.88	1.05	1.07	0.87	0.99
		切片	1.36	0.39	-3.38	0.62	-0.20	0.79	0.29	0.49	0.38	-0.56	-1.12	0.13
		r2	0.999	0.993	0.992	0.915	0.998	0.995	0.997	0.981	0.997	0.997	0.995	0.998
		r	0.999	0.997	0.996	0.957	0.999	0.997	0.998	0.991	0.998	0.999	0.998	0.999
系列4による補正後	実検体の相関 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.00	0.98	0.90	0.65	1.12	1.22	1.30	1.05	0.93	1.06	0.85	0.96
		切片	2.78	0.90	-5.80	1.04	-0.71	1.78	0.61	1.11	0.61	-1.50	-2.67	0.10
		r2	0.999	0.994	0.991	0.910	0.998	0.996	0.998	0.983	0.997	0.997	0.995	0.999
		r	0.999	0.997	0.995	0.954	0.999	0.998	0.999	0.991	0.999	0.998	0.997	0.999

系列4 補正前後比較

実検体	バイアルID（ラベル）	No.	系列4による補正前 平均	SD	CV (%)	系列4による補正後 平均	SD	CV (%)
IVF患者（1～10）	LH検体-1	1	2.04	0.42	20.8	4.83	0.92	19.1
	LH検体-2	2	4.34	0.87	20.1	10.19	2.53	24.8
	LH検体-3	3	7.87	2.48	31.5	17.83	3.36	18.9
	LH検体-4	4	14.97	1.78	11.9	34.87	6.26	17.9
	LH検体-5	5	11.32	1.49	13.2	26.46	5.45	20.6
	LH検体-6	6	14.92	2.23	15.0	34.91	7.77	22.3
	LH検体-7	7	22.74	2.67	11.7	53.05	9.90	18.7
	LH検体-8	8	26.01	3.68	14.2	60.82	13.36	22.0
	LH検体-9	9	39.27	7.35	18.7	92.24	22.43	24.3
	LH検体-10	10	67.80	9.57	14.1	158.87	33.91	21.3
産婦人科以外の患者（11～21）	LH検体-11	1	0.99	0.25	24.8	2.36	0.57	24.1
	LH検体-12	2	2.79	0.46	16.5	6.67	1.29	19.3
	LH検体-13	3	4.62	1.00	21.6	10.99	3.34	30.4
	LH検体-14	4	5.67	1.30	22.9	13.42	4.12	30.7
	LH検体-15	5	11.49	1.60	13.9	27.02	6.36	23.5
	LH検体-16	6	12.21	1.73	14.2	28.71	6.76	23.6
	LH検体-17	7	17.07	1.82	10.7	39.91	7.69	19.3
	LH検体-18	8	23.02	2.35	10.2	53.82	10.07	18.7
	LH検体-19	9	33.58	4.53	13.5	78.29	15.52	19.8
	LH検体-20	10	44.28	6.47	14.6	103.29	20.91	20.2
	LH検体-21	11	77.16	9.57	12.4	178.23	22.83	12.8
			平均CV (%)		16.5	平均CV (%)		21.5





⑤共同実験結果（実検体測定結果での実検体測定値の校正）

WHO 標準品による校正がキット間差縮小に効果が無かった為、プール血清を想定した実検体ベースの標準物質を想定し、それに上位トレーサブルな値付けを施し校正に用いるシミュレーションを実施した。校正方法は以下の通りである。

（1）基準キットの選定

WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）にトレーサブルであることを謳っているキットの中から WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）緩衝液ベースに対して、比較的値を良く伝えていると考えられるキット、かつ、WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）抗原に対し、血清ベース、緩衝液ベースで差が少ないキットを選定した。なお WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）を使用した理由としては、系列３，４（WHO1st IS（96/602）（リコンビナント））が標準品の値を伝達していると判断できなかったためである。検討の結果、３つのキットを選定した。

（2）検量線

選定した３つのキットに関し、WHO2nd IS（80/552）（下垂体由来）緩衝液ベースのオリジナルデータと表示値を用いて検量線を作製した。

（3）実検体の値付け

基準検体（プール血清による、国内標準物質を想定）は No.２，６，11，14，19，21 の各検体とした。３社の実検体のオリジナルデータより（２）の検量線で濃度を算出し、３キットの平均を取って基準値とした。

（4）校正値の算出

Ｎｏ２，６，11，14，19，21 の各検体の各キット測定値と（３）で算出した基準値の比較から校正係数を算出した。校正係数の算出は、基準値と各キット測定値の相関式（Y＝AX）を算出し、校正した。

表10 ： 基準キットの算出

① WHO2nd IS 80/552 又は、NIBSC 80/552にトレーサブルであることを謳っているキット
② WHO2nd IS (80/552) (下垂体由来) に対し、その値を比較的正確に伝えていることが期待されるキット
1) 表示値に対する比の平均が1±0.15
2) 表示値に対する比のバラツキがCV5%以下
③ WHO2nd IS (80/552) (下垂体由来) に対し、血清、緩衝液で差が少ないキット (ベースによる差 5%以下)

① ＜WHO2nd IS 80/552 又は、NIBSC 80/552にトレーサブルであることを謳っているキット＞

	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
WHO 2nd IS 80/552、NIBSC 80/552にトレーサブル	○	○	○	× 1st IRP	○	× 1st IRP	○	○	○	○	○	○

② ＜WHO2nd IS (80/552) (下垂体由来) に対し、その値を比較的正確に伝えていることが期待されるキット＞
判定基準 理論濃度に対する比 平均 1±0.1 かつ CV5%以下

評価用標準品		理論濃度	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
系列(1)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	0												
		2	1.21	1.40	1.01	1.39	1.53	1.92	0.81	1.22	1.07	1.10	0.96	0.85
		5	1.15	1.64	1.09	1.24	1.47	1.82	0.82	1.22	1.04	1.08	1.11	0.85
		20	1.03	1.67	1.11	1.17	1.13	1.81	0.81	1.22	0.99	1.11	0.95	0.86
		50	1.00	1.59	1.18	1.31	1.24	1.78	0.76	1.20	1.07	1.14	1.10	0.90
		100	0.99	1.52	1.18	1.12	1.43	1.76	0.87	1.16	1.05	1.10	0.96	0.94
		200	1.00			1.24			0.73	1.17	1.07	1.13		
		平均	1.06	1.56	1.11	1.24	1.36	1.82	0.80	1.20	1.05	1.11	1.01	0.88
		SD	0.094	0.108	0.073	0.095	0.166	0.060	0.050	0.025	0.030	0.021	0.081	0.041
		CV	8.8	6.9	6.6	7.6	12.2	3.3	6.3	2.1	2.9	1.9	8.0	4.7
											○	○		○

③ WHO2nd IS (80/552) (下垂体由来) 血清ベースと緩衝液ベースの差)
判定基準 ±5%

		コード	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M
2nd IS (80/552) 下垂体由来	相関式の傾き 緩衝液／血清比		1.05	0.99	0.90	0.94	0.78	1.00	1.24	1.07	1.01	1.03	0.91	1.05
			○	○				○			○	○		○

→上記より J，K，Mを基準キットと置いた。

表11 ： 基準キットからの基準値の算出

3社試薬が2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液を用いたとき、理論濃度を示すように検量線を作成する。

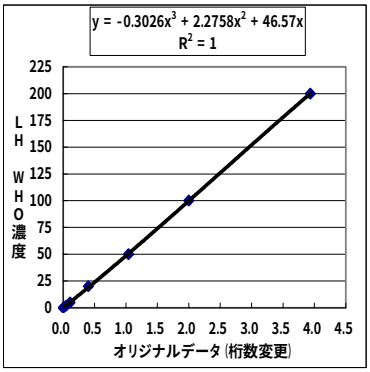
(WHO 試料による検量線：3次式の作成)
1．オリジナルデータの桁数の変更

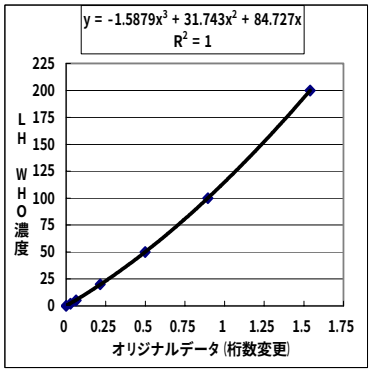
評価用標準品			理論濃度 (mIU/mL)	F 測定結果 (mIU/mL)	F オリジナルデータ	L 測定結果 (mIU/mL)	L オリジナルデータ	Q 測定結果 (mIU/mL)	Q オリジナルデータ
系列 (1)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	1	0	0.00	20,148	0.0	314	0.00	56
		2	2	2.14	65,709	2.2	28,068	1.69	4,966
		3	5	5.21	130,321	5.4	63,953	4.24	12,619
		4	20	19.83	423,419	22.1	215,739	17.18	52,299
		5	50	53.28	1,061,579	56.8	499,527	45.24	139,951
		6	100	104.52	2,019,902	110.4	894,616	93.90	274,676
		7	200	214.27	3,954,333	226.4	1,540,516		

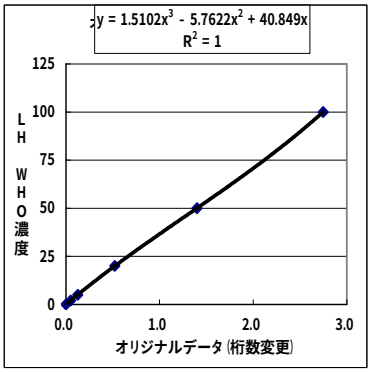
＜オリジナルデータの桁数を変更＞　÷1000000　÷10000000　÷10000000

系列 (1)	2nd IS (80/552) (下垂体由来) 緩衝液	1	0	0.00	0	0.0	0	0.000	0
		2	2	2.14	0.046	2.2	0.028	1.690	0.049
		3	5	5.21	0.110	5.4	0.064	4.240	0.126
		4	20	19.83	0.403	22.1	0.215	17.180	0.522
		5	50	53.28	1.041	56.8	0.499	45.240	1.399
		6	100	104.52	2.000	110.4	0.894	93.900	2.746
		7	200	214.27	3.934	226.4	1.540		

＜桁数変更後のオリジナルデータをX、理論濃度値をYとして3次式を算出 (グラフから) ＞







3社試薬による基準検体濃度の算出

実検体	ハイアルID (ラベル)	No.	＜オリジナルデータ＞ F オリジナルデータ	L オリジナルデータ	Q オリジナルデータ	＜桁数の変更＞ F オリジナルデータ	L オリジナルデータ	Q オリジナルデータ	＜検量線を用いて濃度の算出＞ F 濃度	L 濃度	Q 濃度	MEAN
IVF患者 (1～10)	LH検体-1	1	72,058	24,861	5,698	0.052	0.025	0.056	2.41	2.10	2.29	2.26
	LH検体-2	2	122,125	55,942	13,879	0.102	0.056	0.138	4.75	4.81	5.54	5.04
	LH検体-3	3	174,082	74,161	20,484	0.154	0.074	0.204	7.20	6.43	8.12	7.25
	LH検体-4	4	271,702	159,075	46,746	0.251	0.159	0.467	11.84	14.24	17.97	14.68
	LH検体-5	5	365,269	127,931	35,907	0.345	0.128	0.359	16.31	11.33	13.98	13.87
	LH検体-6	6	356,717	151,890	45,628	0.336	0.152	0.456	15.90	13.57	17.56	15.68
	LH検体-7	7	532,081	228,895	68,074	0.512	0.229	0.680	24.38	21.01	25.60	23.66
	LH検体-8	8	587,200	232,785	76,557	0.567	0.232	0.765	27.07	21.39	28.56	25.67
	LH検体-9	9	922,766	382,747	122,654	0.902	0.382	1.226	43.65	36.96	44.20	41.60
	LH検体-10	10	1,417,618	604,197	205,874	1.397	0.604	2.058	68.68	62.39	72.83	67.97
産婦人科以外の患者 (11～21)	LH検体-11	1	42,349	13,207	2,902	0.022	0.013	0.029	1.02	1.10	1.16	1.09
	LH検体-12	2	79,468	33,270	7,862	0.059	0.033	0.078	2.75	2.83	3.16	2.91
	LH検体-13	3	122,167	56,151	13,940	0.102	0.056	0.139	4.76	4.83	5.57	5.05
	LH検体-14	4	155,084	63,631	17,397	0.135	0.063	0.173	6.31	5.49	6.92	6.24
	LH検体-15	5	262,403	131,983	34,899	0.242	0.132	0.348	11.39	11.70	13.60	12.23
	LH検体-16	6	301,468	131,845	36,473	0.281	0.132	0.364	13.26	11.69	14.19	13.04
	LH検体-17	7	382,094	179,392	51,309	0.362	0.179	0.513	17.12	16.18	19.63	17.64
	LH検体-18	8	508,092	233,165	69,943	0.488	0.233	0.699	23.21	21.43	26.25	23.63
	LH検体-19	9	709,354	317,943	101,591	0.689	0.318	1.015	33.06	30.06	37.12	33.41
	LH検体-20	10	940,135	445,960	140,736	0.920	0.446	1.407	44.52	43.92	50.27	46.24
	LH検体-21	11	1,542,852	693,179	221,111	1.522	0.693	2.211	75.10	73.41	78.46	75.66

表13 ： 値付けされた実検体資料による較正結果

			A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M		
実検体	バイアルID（ラベル）	No.	結果	結果	結果	結果	結果	結果	結果	結果	結果	結果	結果	結果	平均	CV (%)
			mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL	mIU/mL		
IVF患者（1～10）	LH検体-1	1	2.8	1.9		2.0	1.6	1.9	2.1	2.0	2.3	1.9	2.0	2.0	2.04	14.7
	LH検体-2	2	5.6	4.5	2.1	4.3	3.8	4.3	4.7	4.5	4.6	4.4	4.2	4.8	4.31	18.9
	LH検体-3	3	7.3	8.9	11.9	9.3	6.8	7.3	7.1	7.1	7.0	6.0	6.3	7.0	7.67	21.5
	LH検体-4	4	16.6	15.8	11.7	14.2	13.6	14.7	15.9	14.2	16.2	14.3	14.6	15.7	14.80	9.1
	LH検体-5	5	12.4	11.4	8.6	10.6	10.4	12.0	12.4	11.0	11.6	11.0	10.6	12.2	11.18	9.8
	LH検体-6	6	15.7	14.3	11.1	13.4	15.3	17.8	15.3	14.9	15.7	13.6	14.3	15.3	14.73	11.0
	LH検体-7	7	23.8	21.6	20.1	18.8	24.0	21.1	23.9	25.1	24.5	22.1	21.8	22.7	22.46	8.5
	LH検体-8	8	26.8	23.0	21.3	21.9	28.8	29.2	26.8	28.8	27.3	22.6	26.1	25.4	25.67	11.0
	LH検体-9	9	40.6	40.5	37.0	20.4	40.7	41.9	42.0	41.2	44.2	39.6	36.9	40.5	38.79	15.8
	LH検体-10	10	66.4	68.4	65.7	43.7	67.9	69.8	72.7	76.5	69.3	65.7	68.4	70.0	67.04	11.9
産婦人科以外の患者（11～21）	LH検体-11	1	1.5	1.0		0.9	0.6	1.0	0.9	1.1	1.0	0.9	1.1	1.0	1.00	21.4
	LH検体-12	2	3.5	2.6		2.7	2.4	3.0	2.9	3.2	2.7	2.5	2.7	2.7	2.80	11.1
	LH検体-13	3	5.5	5.3	2.2	3.6	4.6	5.8	4.6	5.8	4.6	4.4	4.0	4.8	4.61	22.0
	LH検体-14	4	6.9	5.2	3.0	4.5	5.7	7.2	6.1	7.0	6.1	5.0	4.8	5.9	5.62	21.3
	LH検体-15	5	12.2	14.5	8.6	10.9	11.5	11.6	12.2	12.7	11.2	11.5	8.0	11.8	11.39	15.2
	LH検体-16	6	13.1	13.8	9.0	10.4	11.4	14.0	13.1	13.3	13.0	11.5	10.2	12.4	12.09	13.1
	LH検体-17	7	17.4	20.0	13.8	16.8	16.7	17.4	17.7	17.9	17.0	16.6	14.3	17.2	16.89	9.5
	LH検体-18	8	24.4	25.8	18.7	21.2	23.6	22.4	23.6	24.3	23.3	22.6	20.1	23.3	22.78	8.6
	LH検体-19	9	35.1	31.4	31.1	29.6	33.1	35.1	34.8	38.8	33.4	32.2	28.8	33.6	33.08	8.3
	LH検体-20	10	45.0	48.2	41.6	33.1	45.5	45.9	46.0	38.1	45.0	46.9	41.8	46.4	43.64	9.9
	LH検体-21	11	74.8	76.8	77.5	77.6	76.0	74.3	75.1	72.9	75.7	76.7	78.1	75.7	75.93	2.0
															平均CV	13.1

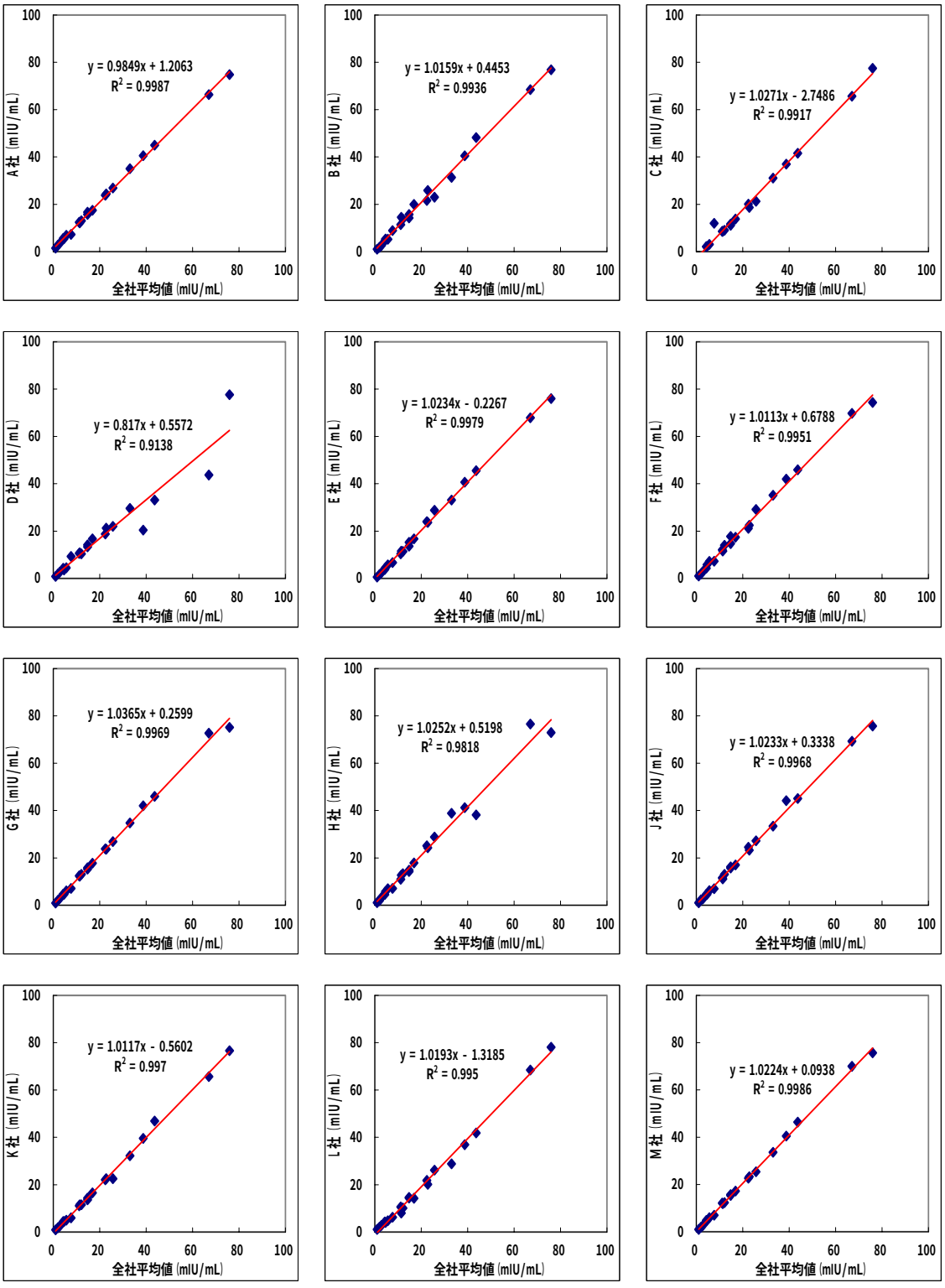
相関式　較正後

														平均	CV
実検体の相関 全検体（1-21） X：全社平均　Y：各社	傾き	0.98	1.02	1.03	0.82	1.02	1.01	1.04	1.03	1.02	1.01	1.02	1.02	1.00	5.9
	切片	1.21	0.45	-2.75	0.56	-0.23	0.68	0.26	0.52	0.33	-0.56	-1.32	0.09		
	r2	0.999	0.994	0.992	0.914	0.998	0.995	0.997	0.982	0.997	0.997	0.995	0.999		
	r	0.999	0.997	0.996	0.956	0.999	0.998	0.998	0.991	0.998	0.998	0.998	0.999		

														平均	CV
実検体の相関 IVF患者（1～10） X：全社平均　Y：各社	傾き	0.99	1.02	0.99	0.58	1.04	1.05	1.09	1.15	1.05	0.99	1.02	1.04	1.00	13.9
	切片	1.23	-0.20	-1.64	3.67	-0.37	0.07	-0.44	-1.41	0.25	-0.59	-0.71	-0.22		
	r2	0.998	0.996	0.984	0.945	0.996	0.995	0.999	0.998	0.996	0.997	0.998	0.999		
	r	0.999	0.998	0.992	0.972	0.998	0.997	1.000	0.999	0.998	0.998	0.999	1.000		

														平均	CV
実検体の相関 産婦人科以外の患者（11～21） X：全社平均　Y：各社	傾き	0.98	1.02	1.06	0.97	1.01	0.98	1.00	0.94	1.00	1.02	1.02	1.01	1.00	2.9
	切片	1.18	1.03	-3.70	-1.14	-0.17	1.04	0.64	1.68	0.25	-0.44	-1.87	0.28		
	r2	0.999	0.993	0.999	0.980	0.999	0.997	0.998	0.986	0.999	0.998	0.994	0.999		
	r	0.999	0.997	0.999	0.990	1.000	0.999	0.999	0.993	1.000	0.999	0.997	0.999		

図3 ： 実検体測定値による臨床検体較正結果



実検体ベースの標準品を想定して各キットの校正を試みたところ、キット間 CV は CV＝13.1 %と縮小する結果を得た。また相関性の傾きは、１２キット中１１キットで 0.90～1.10 の範囲内に入った。
以上の結果の通り、実検体測定結果を用いて校正を行うと各社キットの測定値に収束が見られた。実検体（プール血清）に WHO トレーサブルな値付けを行って基準検体とし、各社のキットの表示値との差分（傾きの差分あるいは比率の差分）を校正することで、現状のキット間差を縮小することが可能である事が示された。

4-4 値付けの設定方法の選択と標準物質の選択

現時点では標準化に必要な標品の組成設定ができていないため、値付けの設定方法を提唱できる段階では無い。今後に更なる検討が必要である。

5．標準物質の作製プロトコル

5-1 トレーサビリティ連鎖

トレーサビリティ連鎖として、以下のモデルが考えられる。

材料	校正 値付け	操作法	実施
①実試料系標準物質 ・抗原：公的標準物質 (WHO) ・ベース：緩衝液			
		②市販キットによる共同実験 ・マトリックスの影響が少ないものを用いる (複数)	?
③校正用標準物質 ・ヒトプール血清			
		④製造業者内測定操作法 ・各社キット	Manufacturer
⑤製造業者内の上位標準品			
		⑥製造業者内測定操作法 ・各社キット	Manufacturer
⑦各社キットのキャリブレータ			
		⑧日常検査法 ・各社キット	End-user
⑨日常試料 (患者血清)			
	⑩測定値		

5-2 試料の性状規格

今回の調査では、ベースの違いによる校正効果はあまり見られなかったが、抗原の違いにより校正効果に差が見られた。各社で使用している抗体の抗原認識の差がキット間差に影響していると考えられる。また下垂体由来抗原、リコンビナント抗原による校正により、校正前よりキット間差が広がったことは、実検体の抗原と標準物質との抗原性の差を示唆するものと思われる。

５-３値付けの方法

トレーサビリティ連鎖のモデルに示したように、WHO 標準品などの公的標準物質を適切なベースに添加して作製したものを上位標準品とし、マトリックスの影響が少ない複数の市販キットを用いた共同実験によってヒトプール血清を値付けしたものを校正用標準物質とする方法が考えられる。

６．今後の課題

今回の結果では、各社キットで共通に使用できる標準物質の設定方法が見いだせなかった。特に実検体を用いた校正が最も適当であった結果からすると、限りなく実検体に近い標品の設定が必要であると思われる。その為にも、ベースとなるマトリックスや抗原の反応性をより詳細に解析した基礎データを蓄積し、実検体の挙動と異なる点を明らかにしていかなければならないと思われる。

７．結び

平成 18 年度の調査、平成 19 年度の共同実験において、LH の標準化の方向性の探求を行い、標準化の考え方を提案するに至った。今後はこの考え方を実行するための具体的作業を、学会、企業団体の協力の基に実行することが望まれる。

今回の検討に使用しました試料の分析や提供および種々のご助言をいただきました慶應義塾大学村田　満　教授に深謝いたします。

JCCLS標準化基本検討委員会　柱１

ワーキンググループ　C５
(LH,FSH)

実行計画書

2006年　　作成：三菱化学ヤトロン　三好
2007年5月29日　　改訂：東ソー株式会社　塚本

Index

‥‥‥ 2

(1) LH

標準化WGにおける作業内容 ‥‥‥ 3

検体調製手順 及び 取り扱い ‥‥‥ 4〜6

結果報告書 (記入用紙) ‥‥‥ 7

(2) FSH

標準化WGにおける作業内容 ‥‥‥ 8

検体調製手順 及び 取り扱い ‥‥‥ 9〜11

結果報告書 (記入用紙) ‥‥‥ 12

注意事項

本検討に用いるヒト検体は、

「ＪＣＣＬＳ標準化基本検討委員会 柱1：臨床検査用標準物質の研究開発」で

測定するヒト検体についての見解 (2006年1月10日)」に従う。

標準化WGにおける作業内容（LH）

決定事項、作業内容、等	備考
(1) 公的な標準品の入手 ①WHO 2nd-IS 80/552（ヒト下垂体由来） ②WHO 1st-IS 96/602（リコンビナント）	 ①35IU/本 ②189IU/本
(2) 抗原の入手（校正用標準品の材料としての抗原候補） 該当なし。	 BiosPacific catalog No.J12020128 Lot# J9782（下垂体由来）、ロート製薬 catalog No.R-507 10,000IU以上/mg, 100μg/本 （リコンビナント）が候補となったが、現段階ではWHO品に限定し検討することとなった。
(3) 抗原添加用ベースの選定 ③血清ベース：ヒト血清 （LH、FSHフリー） ④緩衝液ベース：50mMトリス塩酸緩衝液、150mM NaCl、1.0% BSA、pH7.4	 ③血清ベースはWG参加メーカーの在庫品を使用（詳細情報は公表しないことが条件） ④緩衝液ベースは、昨年のC9のベースを参考とした。 ③、④LH、FSH共通で使用する。
(4) 評価用実検体の準備 ・調査用の実検体の入手（WG参加メーカー分）、濃度レベルごとに実検体をプールして、21例を作成。	 0-20ng/mL :7検体 21-50ng/mL :7検体 51-200ng/mL :7検体 （検体収集が難しい場合、試験までに集まった検体数で実施する。）
(5) 評価用標準品の準備 ・公的な標準品（①、②）をベース（③、④）に添加した評価用標準サンプルを作成する。	 緩衝液ベースにて理論値0、2、5、20、50、100、200mIU/mlを調製する。 ＊抗原2種Xベース2種＝全4系列にて評価する。
(6) 各社キットでの測定 ・各メーカー標準品でそれぞれ検量線を作成し、(4),(5)の評価サンプルを測定する。	 測定回数、ロット数は、各メーカーで判断する。-->代表値を報告する。 測定レンジ外の高濃度サンプルは、実検体のみ希釈して測定する。
(7) 結果集計 ・測定された値を各メーカー間で比較する。	 ①現状評価：各メーカーの標準品を基準にして測定された実検体の相関性を確認する。 ②校正用標準品として適切なものの判別：検体の測定値を一致させるように、各標準サンプルの測定値を補正し、キット間のバラツキの少ない組合せを判別する。 ③収束性評価：キット間のバラツキが最も少なかった標準サンプルが一致するように、測定値を補正し、実検体での相関性の収束性を評価する。 ④それ以外のデータ解析方法についてはWGで協議して、決定する。

2007.4.18修正

検体調製手順 及び 取り扱い (LH)

1. 標準品、精製品購入

公的標準品	購入量
2nd IS 80/552 (ヒト下垂体由来) [35IU/ampoule]	2本
1st IS 96/602 (Recombinant) 189IU/本	2本

2. 資材の準備

1mL分注可能な凍結保存容器	標準サンプル分	448 本	7濃度 x 4系例 x 16セット(予備3セット含む)
	実検体分	336 本	21サンプル x 16セット(予備3セット含む)

(例:アシスト製凍結保存チューブ 品番:72.694.007S 500本入 25000円) x 2個

フリーズボックス (100穴用)	標準サンプル(28本/箱)	16 箱	
	実検体(21本/箱)	16 箱	

(例:アシスト製フリーズボックス 品番:95.100A 100穴用 20箱入 17000円) x 2個
※ 標準サンプルと検体を同じ場所で準備する場合には、両方を1箱にまとめることも可。

3. 希釈用緩衝液の準備 ＊LH、FSH共通。

組成: 50mMトリス塩酸緩衝液、150mM NaCl、1.0% BSA、pH7.4

作成量: 1 L (1項目分の場合は500mlで十分)

調製方法:

1) 以下の試薬を用意する。
- ①2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (Tris)
- ②BSA
- ③塩化ﾅﾄﾘｳﾑ
- ④塩酸

※各試薬のメーカー、グレードは調製メーカーに一任とする

2) Tris 6.057gを精製水0.8Lに溶解する。
3) 塩化ﾅﾄﾘｳﾑ 8.766gを溶解する。
4) 塩酸を適量添加して、pHを7.3に調整する。
5) 液の回転を停止し、BSA 10gを液面に乗せて溶解する。
6) 溶液を0.95Lにﾒｽｱｯﾌﾟする。
7) 塩酸を適量添加して、pHを7.4に調整する。
8) 溶液を1Lにﾒｽｱｯﾌﾟする。
9) pHを確認する (7.4±0.1)。

4. ヒト血清の準備 ＊LH、FSH共通。

		必要量 (1項目分)
購入依頼	ヒト血清 (LH、FSHフリー)	300mL

(詳細な情報は公表しないことを条件として、WG参加メーカーの在庫品を使用する。)

5．評価用標準品の調製

上記標準品･精製品を希釈用緩衝液、又はヒト血清で倍々希釈して以下の評価用標準品を調製する

	標準品（下垂体由来）	希釈液
系列1	2nd IS 80/552	緩衝液
系列2	2nd IS 80/552	ヒト血清

	標準品（ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ）	希釈液
系列3	1st IS 96/602	緩衝液
系列4	1st IS 96/602	ヒト血清

（留意事項）

*希釈系列の濃度は、使用した標準品の表示値を採用する。

*希釈は、各溶液の比重を考慮して重量で実施することが望ましいが、困難の場合は容量で実施しても良い。

*調製したサンプルを凍結保存容器に1mLづつ分注する（分注本数は下記の表を参照）。
1本は凍結融解前後の安定性評価に用いるため、液状、4℃保存。
残りは全て、凍結（-80℃）保存する。

確認測定-->協力メーカー　未定

系列1，系列2　（注）実際に納品された標準品の表示値を確認し、以下の濃度になるように調製する。

2nd IS 80/552　35IU/本

濃度(mIU/mL)	7000	200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品	凍乾末	1	9	5	2	2	2	-	
緩衝液(mL)	5	34	9	15	18	18	18	18	緩衝液（計）　135 mL
	5	35	18	20	20	20	20		
残液量	**3**	**19**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本
濃度(mIU/mL)		200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品		1	9	5	2	2	2	-	
ヒト血清(mL)		34	9	15	18	18	18	18	ヒト血清（計）　130 mL
		35	18	20	20	20	20		
残液量		**19**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本

希釈系列の濃度は、使用した原料の表示値の値を採用する
希釈は、各溶液の比重を考慮して重量で実施することが望ましいが、困難の場合は容量で実施しても良い

系列3，系列4　（注）実際に納品された標準品の表示値を確認し、以下の濃度になるように調製する。

1st IS 96/602 (Recominant)　189IU/本

濃度(mIU/mL)	10000	200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品	凍乾末	1	9	5	2	2	2	-	
緩衝液(mL)	18.9	49	9	15	18	18	18	18	緩衝液（計）　163.9 mL
	18.9	50	18	20	20	20	20		
残液量	**16.9**	**34**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本
濃度(mIU/mL)		200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品		1	9	5	2	2	2	-	
ヒト血清(mL)		49	9	15	18	18	18	18	ヒト血清（計）　145 mL
		50	18	20	20	20	20		
残液量		**34**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本

希釈系列の濃度は、使用した原料の表示値の値を採用する
希釈は、各溶液の比重を考慮して重量で実施することが望ましいが、困難の場合は容量で実施しても良い

6. 評価用標準品の分注

凍結保存容器にラベルをはる
調製したサンプルを凍結保存容器に1mLづつ分注する
*1本だけ、液状で4℃保存用のものを確保しておく。

ラベル例:

系1 LH
200mIU/mL
Lot.xxxxxx

最低必要本数

	200	100	50	20	5	2	0		
メーカー配布用	12	12	12	12	12	12	12	12	凍結保存
予備	3	3	3	3	3	3	3	3	
凍結融解確認用	1	1	1	1	1	1	1	1	--> 液状保存
計	16	16	16	16	16	16	16	16	

(注) 残液は、後の有効利用を考えて分注保存しておくことが望ましい。

7. 評価用標準品の凍結融解前後の安定性試験

・凍結融解による濃度変化を確認するため、液状品(4℃保存) 1本、凍結品 (-80℃) 1本について、LHを測定する。
・測定試薬は1キットでよい。協力メーカーに送付して測定する。(未定)
・液状での安定性を考慮して、作成から測定まではできるだけ短期間に実施することが適切。

8. 評価用実検体の準備

以下の種別の検体 各16mL分を JCCLSに依頼し、入手する

	LH検体
0-20mIU/mL	7検体
21-50mIU/mL	7検体
51-200ng/mL	7検体

9. 評価用実検体の分注

凍結保存容器にラベルをはる
実検体を凍結保存容器に1mLづつ分注する

最低必要本数

	200	
メーカー配布用	12	凍結保存
予備	3	
計	15	

(注) 残液は、後の有効利用を考えて分注保存しておくことが望ましい。

10. 評価用標準品、評価用実検体の保存、発送

・分注の終了した評価用標準品、評価用実検体は、各メーカーごとにフリーズボックスに入れて、－80℃で保存する
・予備分の評価用標準品、評価用実検体、及び分注残も－80℃で保存する
・ただし、凍結融解前後の評価に用いる、評価用標準品の1ml分のみは冷蔵(4℃) 保存する。
・評価用標準品、評価用実検体を発送する場合は、ドライアイスを手配して、凍結状態で発送する

JCCLS標準化基本検討委員会　柱1　ワーキンググループ　C5 [LH]
評価用検体測定結果報告書

会社名　　担当者

試薬名

測定原理

□ RIA (ラジオイムノアッセイ)
□ FIA (蛍光免疫測定法)
□ CLIA (化学発光免疫測定法)
□ ECLIA (電気化学発光免疫測定法)
□ EIA (酵素免疫測定法)
□ FEIA (蛍光酵素免疫測定法)
□ CLEIA (化学発光酵素免疫測定法)
□ その他

測定機器

測定単位

ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰの単位

検体希釈液

較正結果

標準品	表示値	ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰ
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

多重測定した場合の測定結果は、各メーカーによって平均値、中央値等を判断して代表値を記入してください。

評価用検体測定結果 (LH)

No.	検体	測定結果	ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰ	希釈の有無	希釈倍数	その他
1	系列1　0[mIU/mL]			□有 □無		
2	2			□有 □無		
3	5			□有 □無		
4	20			□有 □無		
5	50			□有 □無		
6	100			□有 □無		
7	200			□有 □無		
8	系列2　0[mIU/mL]			□有 □無		
9	2			□有 □無		
10	5			□有 □無		
11	20			□有 □無		
12	50			□有 □無		
13	100			□有 □無		
14	200			□有 □無		
15	系列3　0[mIU/mL]			□有 □無		
16	2			□有 □無		
17	5			□有 □無		
18	20			□有 □無		
19	50			□有 □無		
20	100			□有 □無		
21	200			□有 □無		
22	系列4　0[mIU/mL]			□有 □無		
23	2			□有 □無		
24	5			□有 □無		
25	20			□有 □無		
26	50			□有 □無		
27	100			□有 □無		
28	200			□有 □無		

No.	検体	測定結果	ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰ	希釈の有無	希釈倍数	その他
29	実検体　1			□有 □無		
30	2			□有 □無		
31	3			□有 □無		
32	4			□有 □無		
33	5			□有 □無		
34	6			□有 □無		
35	7			□有 □無		
36	8			□有 □無		
37	9			□有 □無		
38	10			□有 □無		
39	11			□有 □無		
40	12			□有 □無		
41	13			□有 □無		
42	14			□有 □無		
43	15			□有 □無		
44	16			□有 □無		
45	17			□有 □無		
46	18			□有 □無		
47	19			□有 □無		
48	20			□有 □無		
49	21			□有 □無		

2-4-2-4　卵胞刺激ホルモン（　FSH）

要旨

1）卵胞刺激ホルモン（Follicle Stimulating Hormone (略称：FSH)）の測定について、各試薬の実試料系標準物質によるデータ統一化の可能性とその問題点に関する調査研究および実試料系標準物質候補品を調製・使用し、キットのデータ標準化について検証を行うことを目的とした調査研究を実施した。

2）昨年度の標準化に関する調査研究において、全てのキットが公的標準物質（WHO）を上位標準としたトレーサビリティ体系で実試料系標準物質候補品作成による有効性が高い項目として確認されたため、本年度は実試料系標準物質候補品を使用した共同実験により測定値の収束性を検討した。方法は、各メーカー使用のキャリブレータおよび実試料系標準物質候補品を用いて実試料の測定値の収束性により評価した。

3）解析方法として各試薬間の測定値のバラツキ、全社平均値を対象にした場合のバイアス、相関係数および回帰式により検証した。

4）WHO 標準品（下垂体由来品、またはリコンビナント品）をベース血清または緩衝液に添加して作成した実試料系標準物質で補正をおこなった場合には、十分な収束性は認められなかった。

5）実試料（ヒトプール血清）による補正をおこなった場合、補正前の実試料の測定値より明らかな収束性を確認することができた。

6）トレーサビリティ連鎖のモデルとして、公的標準物質（WHO）を適切なベースに添加して作成したものを上位標準品とし、マトリックスの影響が少ない複数の市販キットを用いた共同実験によってヒトプール血清（抗原未添加）を値付けしたものを校正用標準物質とする方法が考えられた。しかし、キットの選択方法、共通の標準物質に用いるヒトプール血清の性状などの選択条件や保存条件等、多くの課題が残されている。

1．目的

本調査研究項目群、C5-WG（プロラクチン、E2、LH、FSH、プロゲステロン、テストステロン）内の FSH について、「実試料系標準物質候補品を調製・使用し各社キットのデータの標準化について検証を行う」ことが本調査研究の目的である。

2．委員会の構成

本委員会は、調査研究項目の柱１C5-WG でメンバーの構成を下記に記す。

なお WG 発足以降、メンバーの入れ替わりがあったため、下表は 19 年度報告書作成時のメンバーとした。

	氏名	所属

	氏名	所属
アドバイザー	家入蒼生夫	獨協医科大学
アドバイザー	小田桐恵美	東京女子医科大学
アドバイザー	桑　克彦	筑波大学
アドバイザー	森下 芳孝	名古屋大学
アドバイザー	谷　渉	検査医学標準物質機構（ReCCS） （旧名：HECTEF スタンダードレファレンスセンター）
運営管理者 （臨薬協）	大和 隆	協和メデックス株式会社
責任者	塚本 久雄	東ソー株式会社
技術担当者	髙　瑛姫	アボットジャパン株式会社
技術担当者 （FSH 担当）	伊東　立雄	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	御子柴　浩	オリンパス株式会社
技術担当者	誉田　大仁	三洋化成工業株式会社
技術担当者 （FSH 担当）	前田　英征	株式会社テイエフビー
技術担当者	齋藤　憲祐	デイド　ベーリング株式会社
技術担当者	山崎　智之	日水製薬株式会社
技術担当者	坂本　純一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	梅田　和之	富士レビオ株式会社
技術担当者	伊東　理絵	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	三好　欣也	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	松本　幹雄	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

３．委員会の開催

第１回会合：2005/11/15（火）14：00～16：15　（臨薬協会議室）
第２回会合：2005/12/02（金）10：00～12：30　（臨薬協会議室）
第３回会合：2006/01/12（木）13：00～17：30　（臨薬協会議室）
第４回会合：2006/02/14（火）13：30～17：00　（臨薬協会議室）
第５回会合：2006/03/23（木）13：30～17：30　（臨薬協会議室）
第６回会合：2006/04/25（火）13：30～17：30　（臨薬協会議室）
第７回会合：2007/09/25（月）14：00～18：00　（臨薬協会議室）
第８回会合：2007/01/16（火）14：00～17：30　（臨薬協会議室）
第９回会合：2007/02/20（火）13：30～16：30　（臨薬協会議室）

第 10 回会合：2007/04/04（水）14：00～16：00　（臨薬協会議室）
第 11 回会合：2008/01/25（金）13：30～17：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１測定値の互換性の現状

１）現状の調査

昨年度報告済みのため省略

２）現状把握のための共同実験

①実行計画書

本報告書の最後に添付した実行計画書「資料１」に従って共同実験を実施した。

なお、検討に用いた実血清検体は、「JCCLS 標準化基本検討委員会　柱１：臨床検査用標準物質の研究開発」で測定するヒト検体についての見解（2006 年 1 月 10 日)」に従って配布した。

②プール血清検体による現状の確認

方法は、各社血清測定のプロトコルに従い、プール血清検体 21 種類（IVF 症例：9 種類、産婦人科以外の症例：12 種類）を測定し、測定値比較および収束性を確認した。

③WG 作製の実試料系標準物質候補品（4 系列）による現状の確認

方法は、各社血清測定のプロトコルに従い、下記 4 系列（調製濃度は、0, 2, 5, 20, 50, 100, 200 mIU/mL）を検体として測定し、測定値と理論値に対する比率をグラフ化し傾向を確認した。

なお、実試料系標準物質候補品の作製は検査医学標準物質機構（旧名：HECTEF スタンダードレファレンスセンター）に委託した。

	添加抗原（WHO 標準品）	ベース
系列１	NIBSC IS 83/575（下垂体由来）	トリス緩衝液
系列２	NIBSC IS 83/575（下垂体由来）	ヒト血清（FSH フリー）
系列３	NIBSC 1st IS 92/510（リコンビナント）	トリス緩衝液
系列４	NIBSC 1st IS 92/510（リコンビナント）	ヒト血清（FSH フリー）

３）共同実験結果

①プール血清検体による現状の確認

IVF 患者と産婦人科以外の患者の測定値とそれぞれ全体平均値との回帰式の傾きで比較した場合、全ての試薬に関して大きな差は認められなかった。よって、両者を区別する解析は実施しなかった。全社平均値に対する相関式の傾きは、0.68～1.38（平均

1.00)、相関係数は 0.99 以上となった。
全検体の測定値の平均 CV は 19.3 %であり、十分な収束性は得られなかった。ただし、各測定値の、全社平均値に対するバイアスを見ると、低濃度から高濃度までほぼ一定であったが、全社平均値と比較すると±40%のバイアスを示す試薬もあった。(図表１，２，３，４)

②実試料系標準物質候補品（4 系列）による現状の確認
リコンビナント抗原（系列３,４）は理論濃度に近い測定値を示すキットが多かったが、下垂体由来抗原（系列１,２）では全てのキットが理論濃度の 1/2 程度の測定値を示した。また、下垂体由来抗原では、理論値と実測値に対する傾向が各試薬でほぼ同じであったが、リコンビナント抗原（系列３,４）では、傾向に差を示す試薬が認められた。（図表５）

４）考察
各試薬について実試料系標準物質候補品の測定値と理論値から補正係数を求め、それぞれのプール血清検体（21 検体）について再計算し測定値を補正したが、補正前の平均 CV19.3 %が、系列１では CV20.8 %、系列２では CV13.1 %、系列３では CV23.7 %、系列４では CV16.0 %となり、系列２、４においては、若干の改善は見られたが十分な収束性は見られなかった。このことより、今回の検討で作製された実試料系標準物質候補品は、実試料系標準物質としては不十分であると確認された。（図表６，７，８，９，10）
なお、下垂体由来抗原（系列１，２）の理論濃度と測定値の差が大きかった点については、追試による再現性の確認が必要と考えられる。

4－2 標準化および標準物質の設定経過
追加検討として、共同実験に使用した実検体（ヒトプール血清）を標準品と想定し、それによる各試薬の測定値の補正を試みたところ、傾きによる補正により CV5.2 %と縮小する結果を得た。また、全社平均値に対する各試薬の回帰式の傾きは 12 キット中 12 キットが傾き 0.90～1.10 の範囲内に入る結果となった。
さらに、上位標準物質とのトレーサビリティ体系を確立するため、実試料系標準物質候補品（系列３,４）の理論濃度とある程度一致していた複数のキットを用いて、補正に用いる実検体の濃度を決定し各社の補正を行った。
抗原未添加の実試料（ヒトプール血清）を校正用標準物質とすることで十分な収束性が得られることが確認された。（図表 11，12，13，14）

4－3 値付けの設定方法の選択
今後の検討が必要。

5．標準物質の設定概要

今後の検討が必要。

6．標準物質の作成プロトコル

6-1トレーサビリティ連鎖

トレーサビリティ連鎖として、以下のモデルが考えられる。

6-2試料の性状規格

今回の調査でヒトプール血清（抗原未添加）であれば測定値の収束性が改善することが確認された。しかし、検体の個体間差や干渉物質が含まれる可能性もあるなど、ヒト血清の収集方法については課題が多い。

6-3値付けの方法

トレーサビリティ連鎖のモデルに示したように、WHO標準品などの公的標準物質を適切なベースに添加して作成したものを上位標準品とし、マトリックスの影響が少ない複数の市販キットを用いた共同実験によってヒトプール血清（抗原未添加）を値付けしたものを校正用標準物質とする方法が考えられる。

7．今後の課題

今回は、理論濃度とある程度一致していた複数の試薬を用いて、補正に用いる実検体の濃度を決定したが、実検体に対する値付けと上位標準品とのトレーサビリティ体系を確立する必

要がある。

キットの選択方法、共通の標準物質に用いるヒトプール血清の性状などの選択条件や保存条件等、多くの課題が残されている。

８．結び

平成 18 年度の調査、平成 19 年度の共同実験において、FSH の標準化の方向性の探求を行い、標準化の考え方を提案するに至った。今後はこの考え方を実行するための具体的作業を、学会、企業団体の協力の基に実行することが望まれる。

今回の検討に使用しました試料の分析や提供および種々のご助言をいただきました慶應義塾大学　村田　満　教授に深謝いたします。

図表１：プール血清検体の測定結果および全体平均値に対する相関

実検体	バイアルID（ラベル）	No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV (%)
			測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果	測定結果			
			(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)	(mIU/mL)			
IVF患者（1〜9）	FSH検体-1	29	1.7	2.4	1.8	1.6	1.8	1.9	2.0	2.0	1.1	1.7	1.6	1.6	1.76	0.32	18.3
	FSH検体-2	30	5.3	9.5	7.0	6.3	7.5	7.6	7.4	8.2	4.0	6.6	6.4	6.5	6.86	1.38	20.1
	FSH検体-3	31	9.2	17.8	11.6	14.3	13.4	13.2	12.5	14.3	6.9	11.3	11.2	11.5	12.25	2.74	22.4
	FSH検体-4	32	16.5	30.4	20.2	19.9	23.3	24.6	22.3	26.5	13.7	21.1	20.6	22.5	21.81	4.36	20.0
	FSH検体-5	33	18.3	35.8	24.6	25.1	25.7	29.0	25.1	31.1	16.0	23.2	22.7	27.8	25.37	5.31	20.9
	FSH検体-6	34	23.9	36.9	30.5	29.8	34.0	36.7	33.3	38.3	19.7	30.9	28.2	32.5	31.22	5.43	17.4
	FSH検体-7	35	36.5	61.7	44.9	44.9	49.8	53.4	49.6	57.9	31.0	46.8	44.9	46.5	47.31	8.37	17.7
	FSH検体-8	36	54.1	96.2	68.1	72.4	79.2	82.0	75.1	88.9	50.4	67.9	68.0	76.7	73.26	13.04	17.8
	FSH検体-9	37	82.2	163.6	106.6	115.8	124.2	130.8	124.0	138.8	79.0	110.1	105.6	129.7	117.52	23.44	19.9
産婦人科以外の患者（10〜21）	FSH検体-10	38	3.2	5.3	4.1	3.6	4.5	4.4	4.6	4.8	2.4	3.8	3.4	3.9	4.00	0.78	19.5
	FSH検体-11	39	6.0	10.8	8.4	7.7	9.6	9.2	9.1	10.4	4.9	7.9	7.6	9.4	8.41	1.72	20.4
	FSH検体-12	40	12.1	23.3	15.7	15.4	18.0	18.3	16.7	20.2	10.4	15.4	14.5	18.3	16.53	3.47	21.0
	FSH検体-13	41	19.1	38.4	24.0	23.9	30.2	30.2	27.1	32.4	17.8	24.9	22.4	30.5	26.74	5.89	22.0
	FSH検体-14	42	27.2	51.4	32.6	34.1	39.6	40.0	37.0	41.9	24.6	33.1	31.6	38.1	35.93	7.11	19.8
	FSH検体-15	43	35.8	62.9	44.3	46.1	52.3	52.6	49.1	57.1	32.0	46.2	40.1	49.7	47.34	8.69	18.4
	FSH検体-16	44	41.0	71.4	48.8	47.9	56.1	58.0	54.0	63.1	35.0	48.5	44.4	55.1	51.94	9.88	19.0
	FSH検体-17	45	44.1	73.2	52.5	59.0	59.0	65.5	59.9	67.6	38.3	52.5	50.8	62.7	57.08	9.96	17.4
	FSH検体-18	46	55.2	87.6	64.6	58.9	70.1	75.4	70.2	80.9	44.7	64.2	58.9	79.6	67.53	12.24	18.1
	FSH検体-19	47	58.4	101.8	71.2	71.9	79.7	82.0	78.3	88.7	51.8	72.1	68.0	83.7	75.63	13.33	17.6
	FSH検体-20	48	66.1	113.2	79.9	79.2	87.4	89.1	84.0	98.9	55.8	78.0	72.8	98.1	83.55	15.45	18.5
	FSH検体-21	49	106.0	188.6	125.3	135.7	133.9	141.2	142.0	150.7	87.9	126.1	114.8	141.0	132.77	24.91	18.8
															平均CV (%)		19.3

実試料の相関 全検体(1-21)

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV (%)
	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10	1.000	0.185	18.5
実検体の相関	切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68			
全検体 (1-21)	r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953			
X:全社平均 Y:各社	r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976			

実試料の相関 IVF患者(1-9)

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV (%)
	傾き	0.70	1.37	0.91	0.98	1.06	1.11	1.05	1.19	0.68	0.93	0.90	1.10	1.000	0.194	19.4
	切片	1.13	-0.93	1.05	-0.21	0.07	0.38	-0.35	0.59	-0.99	0.47	0.44	-1.66			
IVF患者 (1〜9)	r2	0.9979	0.9969	0.9994	0.9990	0.9996	0.9997	0.9995	0.9996	0.9993	0.9991	0.9992	0.9979			
X:全社平均 Y:各社	r	0.9990	0.9985	0.9997	0.9995	0.9998	0.9999	0.9998	0.9998	0.9996	0.9996	0.9996	0.9989			

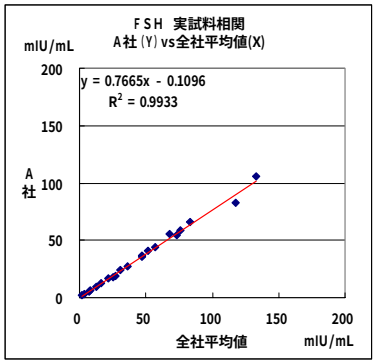
実試料の相関 産婦人科以外の検体(10-21)

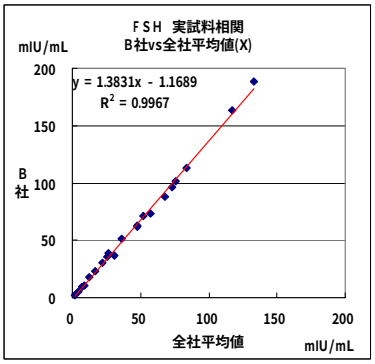
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV (%)
	傾き	0.80	1.39	0.95	1.00	1.01	1.07	1.06	1.14	0.67	0.95	0.87	1.09	1.000	0.181	18.1
産婦人科以外の患者	切片	-1.22	-1.39	-0.34	-2.18	2.38	1.57	-0.76	1.82	-0.07	-0.28	0.00	0.47			
(10〜21)	r2	0.9988	0.9963	0.9995	0.9932	0.9985	0.9985	0.9987	0.9987	0.9994	0.9995	0.9992	0.9941			
X:全社平均 Y:各社	r	0.9994	0.9982	0.9997	0.9966	0.9992	0.9993	0.9993	0.9994	0.9997	0.9997	0.9996	0.9970			

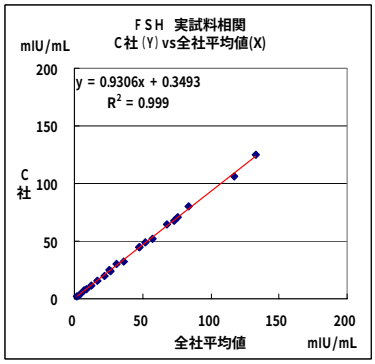
図表２：プール血清測定値の全社平均値に対するバイアス

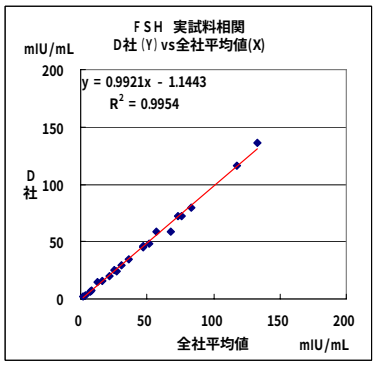
実試料	バイアルID（ラベル）	No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	最大	最小	レンジ
			ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ	ズレ			
			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
IVF患者（1〜9）	FSH検体-1	29	-5.1	36.4	4.0	-10.2	0.1	8.0	12.6	15.6	-39.5	-2.2	-8.5	-11.3	36.4	-39.5	75.9
	FSH検体-2	30	-22.2	38.4	1.9	-7.9	8.9	10.8	7.8	19.6	-41.1	-3.8	-7.2	-5.2	38.4	-41.1	79.6
	FSH検体-3	31	-25.2	45.3	-5.6	16.4	9.0	7.7	2.0	16.7	-44.0	-7.4	-8.7	-6.1	45.3	-44.0	89.3
	FSH検体-4	32	-24.3	39.4	-7.2	-8.6	6.9	12.8	2.3	21.6	-37.4	-3.1	-5.4	3.0	39.4	-37.4	76.8
	FSH検体-5	33	-27.9	41.1	-2.9	-1.0	1.2	14.3	-1.0	22.4	-36.8	-8.7	-10.4	9.6	41.1	-36.8	78.0
	FSH検体-6	34	-23.4	18.2	-2.4	-4.7	8.8	17.6	6.7	22.7	-36.9	-1.0	-9.7	4.1	22.7	-36.9	59.7
	FSH検体-7	35	-22.9	30.4	-5.1	-5.1	5.2	12.9	4.8	22.3	-34.6	-1.2	-5.2	-1.7	30.4	-34.6	65.0
	FSH検体-8	36	-26.2	31.3	-7.0	-1.2	8.1	11.9	2.5	21.4	-31.2	-7.3	-7.2	4.7	31.3	-31.2	62.5
	FSH検体-9	37	-30.1	39.2	-9.3	-1.5	5.7	11.3	5.5	18.1	-32.8	-6.3	-10.2	10.3	39.2	-32.8	72.0
産婦人科以外の患者（10〜21）	FSH検体-10	38	-19.8	32.4	2.4	-10.0	12.4	9.9	13.7	19.7	-39.9	-4.0	-14.5	-2.3	32.4	-39.9	72.3
	FSH検体-11	39	-29.0	28.4	-0.1	-8.6	13.5	9.4	8.5	23.4	-41.4	-5.7	-10.0	11.6	28.4	-41.4	69.8
	FSH検体-12	40	-26.8	41.0	-5.1	-6.9	9.0	10.7	1.1	22.3	-37.0	-6.7	-12.3	10.5	41.0	-37.0	78.0
	FSH検体-13	41	-28.6	43.6	-10.3	-10.5	13.0	12.9	1.3	21.1	-33.4	-6.7	-16.4	13.9	43.6	-33.4	77.0
	FSH検体-14	42	-24.3	43.1	-9.4	-5.2	10.3	11.3	3.0	16.7	-31.4	-7.8	-12.1	5.9	43.1	-31.4	74.5
	FSH検体-15	43	-24.4	32.9	-6.4	-2.6	10.5	11.1	3.7	20.5	-32.5	-2.5	-15.3	4.9	32.9	-32.5	65.3
	FSH検体-16	44	-21.1	37.5	-6.1	-7.8	8.0	11.7	4.0	21.5	-32.6	-6.6	-14.6	6.2	37.5	-32.6	70.1
	FSH検体-17	45	-22.7	28.2	-8.0	3.3	3.4	14.7	4.9	18.4	-32.9	-8.1	-11.1	9.8	28.2	-32.9	61.1
	FSH検体-18	46	-18.3	29.7	-4.4	-12.8	3.9	11.7	4.0	19.9	-33.9	-4.9	-12.7	17.9	29.7	-33.9	63.6
	FSH検体-19	47	-22.8	34.6	-5.9	-5.0	5.4	8.4	3.5	17.3	-31.5	-4.7	-10.1	10.7	34.6	-31.5	66.1
	FSH検体-20	48	-20.9	35.5	-4.4	-5.2	4.6	6.6	0.5	18.4	-33.2	-6.7	-12.8	17.4	35.5	-33.2	68.7
	FSH検体-21	49	-20.2	42.1	-5.6	2.2	0.9	6.4	7.0	13.5	-33.8	-5.0	-13.6	6.2	42.1	-33.8	75.8
全社平均値からのバイアス量の平均 (%) レベル1〜5			-23.1	35.7	-4.6	-4.4	7.1	11.1	4.7	19.7	-35.6	-5.3	-10.8	5.7	35.9	-35.6	71.5
全社平均値からのバイアス量の平均 (%) レベル2〜5			-23.9	35.7	-5.7	-5.1	7.8	10.6	4.5	19.4	-34.1	-5.9	-12.4	9.1	35.7	-34.1	69.8

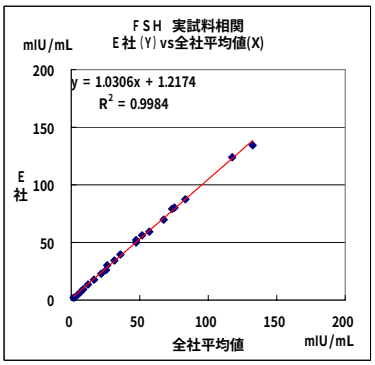
図表３：各社の実試料測定値と全社平均との相関

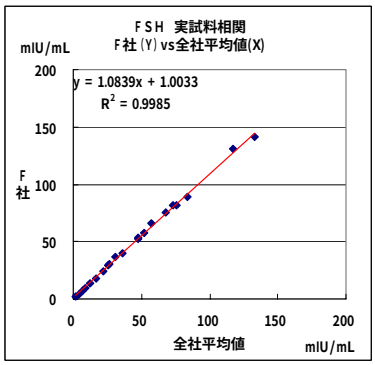


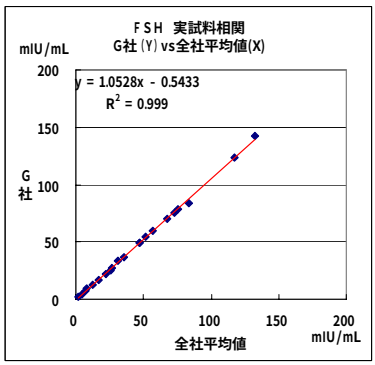


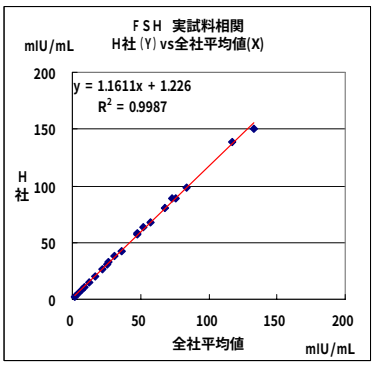


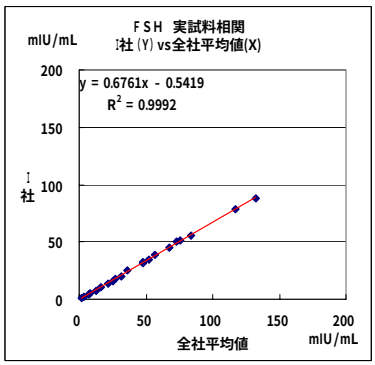


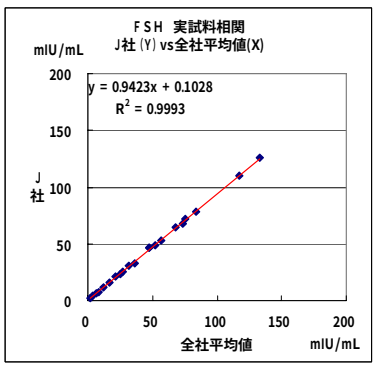


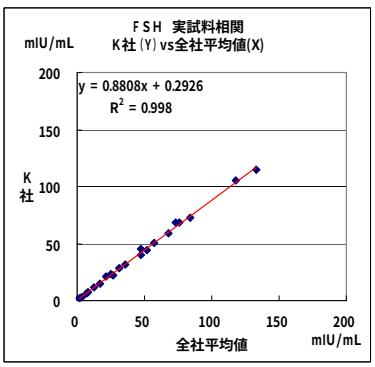


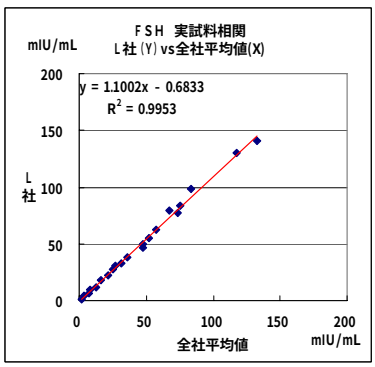




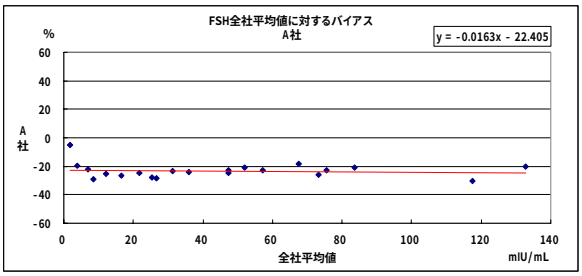


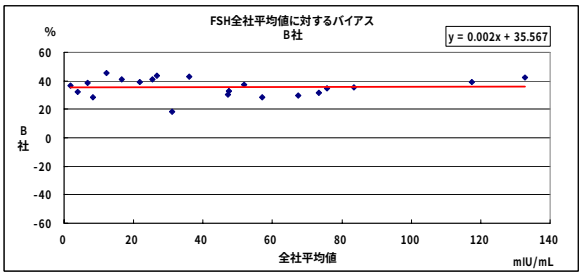


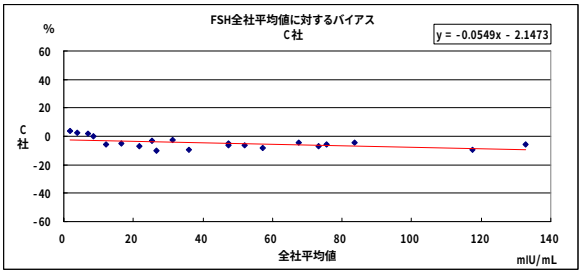


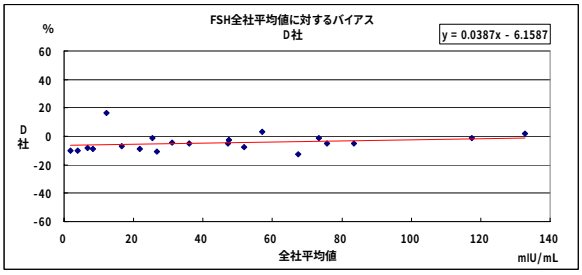


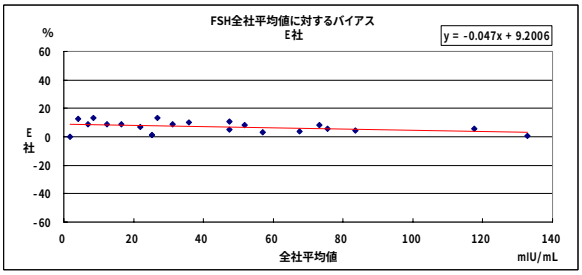
図表４：各社のプール血清測定値のバイアス

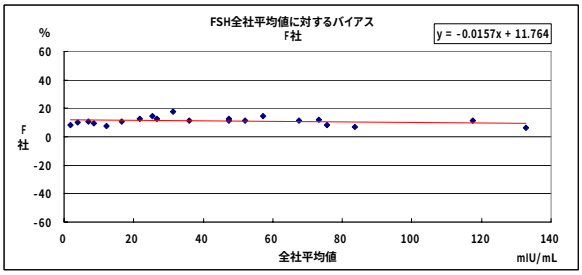


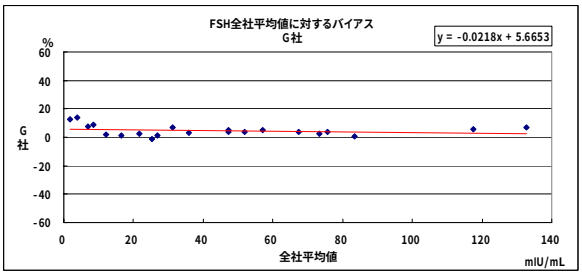


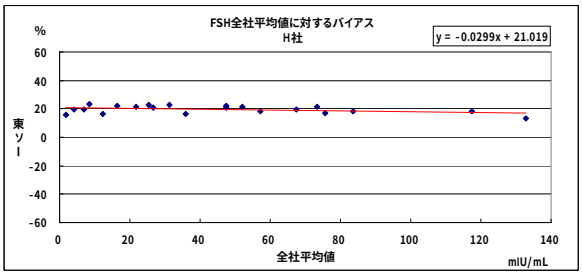


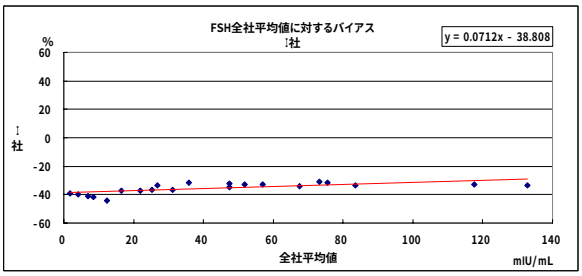


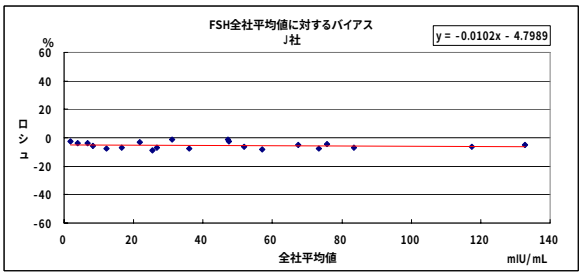


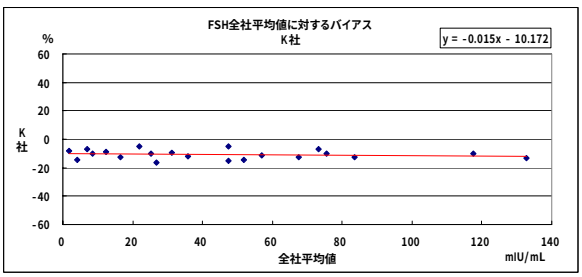


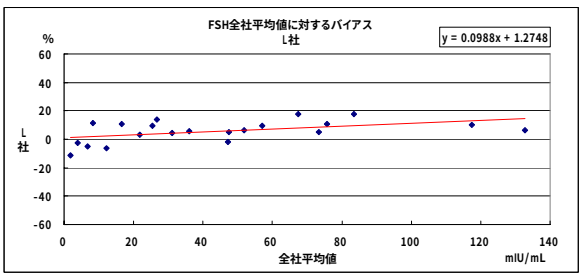




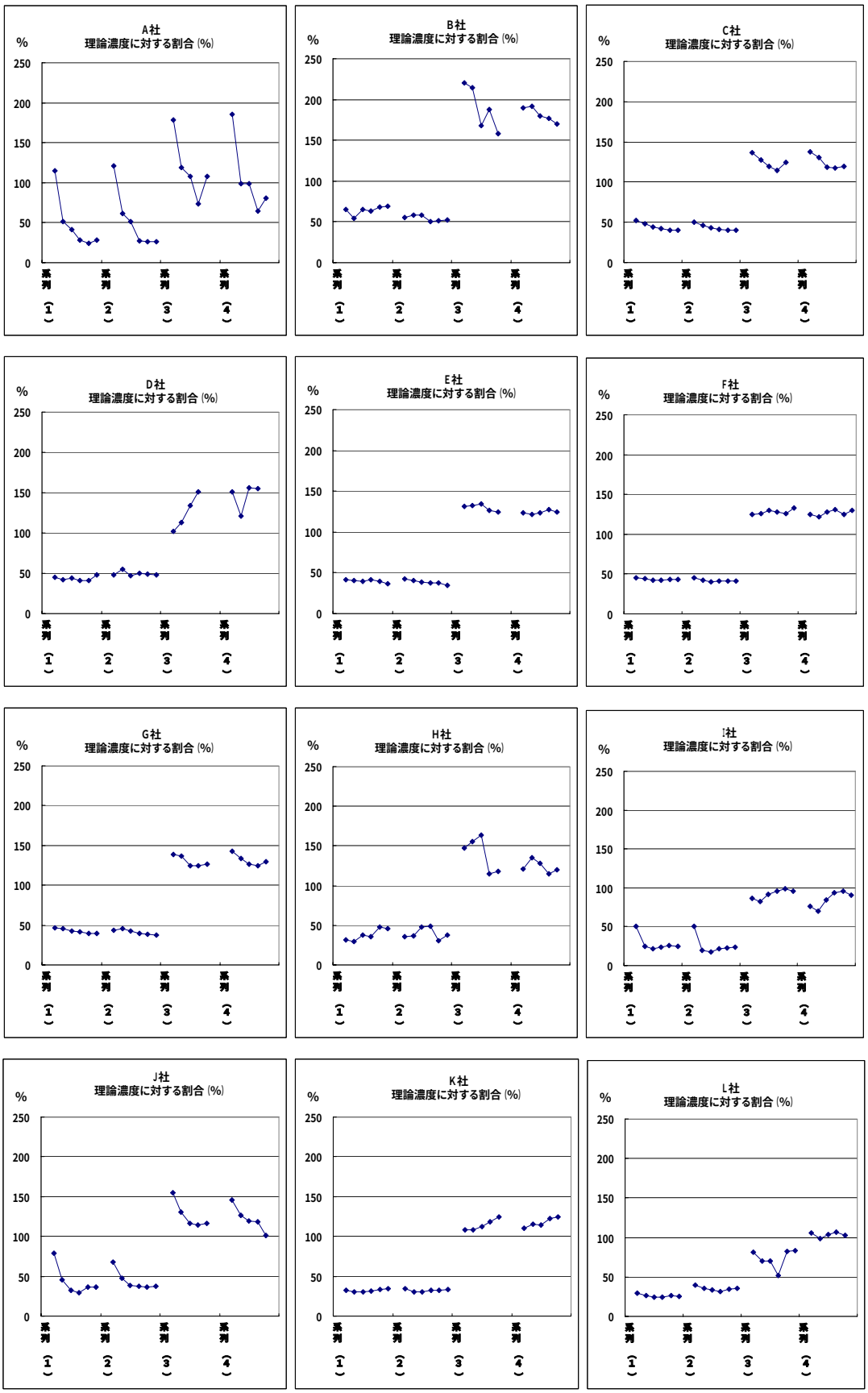








図表５：実試料系標準物質候補品（4 系列）の理論濃度に対する割合



図表６：実試料系標準物質候補品（4 系列）からの補正係数の算出

(1) 系列1　IS (83/575) (下垂体由来) 緩衝液ベースによる補正係数算出

			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV
系列 (1)	IS 83/575 (下垂体由来) 緩衝液	0	1.87	0.00		0.10	0.00		0.0	0.00	1.00	1.12		0.13	0.47	0.69	
		2	2.30	1.30	1.04	0.90	0.83	0.9	0.9	0.63	1.00	1.58	0.65	0.58	1.05	0.48	45.8
		5	2.55	2.70	2.43	2.12	2.05	2.2	2.3	1.47	1.26	2.29	1.54	1.31	2.02	0.50	24.7
		20	8.35	13.10	8.88	8.73	7.98	8.5	8.6	7.45	4.30	6.40	6.12	4.91	7.78	2.28	29.3
		50	14.00	31.8	21.00	20.52	20.73	21.3	20.7	17.72	11.75	14.61	15.79	12.3	18.52	5.50	29.7
		100	23.70	68.0	40.48	41.18	39.84	43.7	39.5	48.01	25.79	36.51	32.94	26.0	38.81	11.95	30.8
		200	57.40	138.9	80.80	95.32	73.07	87.7	78.3	91.02	50.32	73.06	69.44	51.0	78.86	23.95	30.4
系列(1)の相関式 レベル1～6		傾き	0.22	0.68	0.40	0.41	0.40	0.44	0.40	0.47	0.25	0.35	0.33	0.26			
		Y切片	2.30	-0.49	0.55	0.16	0.10	-0.12	0.35	-1.32	0.13	0.16	-0.26	-0.07			
補正係数F (レベル1～6)			3.97	1.49	2.44	2.43	2.49	2.30	2.50	2.21	3.97	2.86	3.07	3.89			
補正係数の逆数　1／F			0.25	0.67	0.41	0.41	0.40	0.43	0.40	0.45	0.25	0.35	0.33	0.26			
補正係数F (レベル1～7)			3.59	1.45	2.47	2.17	2.67	2.29	2.54	2.20	3.97	2.77	2.92	3.91	→採用		
補正係数の逆数　1／F			0.28	0.69	0.41	0.46	0.37	0.44	0.39	0.45	0.25	0.36	0.34	0.26			

(2) 系列2　IS (83/575) (下垂体由来) ヒト血清ベースによる補正係数算出

			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV
系列 (2)	IS 83/575 (下垂体由来) ヒト血清	0	2.19	0.10	0.05	0.13	0.02	0.00	0.0	0.00	1.00	0.66		0.18	0.39	0.68	
		2	2.42	1.10	1.00	0.97	0.85	0.9	0.9	0.72	1.00	1.35	0.68	0.80	1.05	0.47	44.1
		5	3.09	2.90	2.33	2.74	2.04	2.1	2.3	1.84	1.00	2.37	1.54	1.76	2.16	0.59	27.3
		20	10.20	11.70	8.68	9.44	7.76	8.0	8.6	9.59	3.48	7.69	6.14	6.81	8.17	2.11	25.8
		50	13.50	25.2	20.37	24.77	18.56	20.5	19.8	24.26	10.56	18.51	16.04	15.9	19.00	4.51	23.8
		100	26.50	51.4	40.23	49.49	37.31	41.5	38.8	30.96	22.36	36.67	32.35	34.3	36.82	8.46	23.0
		200	52.20	104.6	79.61	96.15	69.93	82.3	75.8	74.70	46.79	74.59	66.02	70.2	74.41	16.07	21.6
系列(2)の相関式 レベル1～6		傾き	0.24	0.51	0.40	0.49	0.37	0.41	0.39	0.33	0.22	0.36	0.32	0.34			
		Y切片	2.60	0.38	0.30	0.01	0.13	-0.06	0.32	1.57	0.14	0.58	-0.13	-0.02			
補正係数F (レベル1～6)			3.64	1.94	2.47	2.02	2.67	2.42	2.56	2.87	4.55	2.72	3.10	2.96			
補正係数の逆数　1／F			0.27	0.51	0.40	0.49	0.37	0.41	0.39	0.35	0.22	0.37	0.32	0.34			
補正係数F (レベル1～7)			3.78	1.92	2.50	2.07	2.81	2.43	2.62	2.72	4.34	2.69	3.05	2.88	→採用		
補正係数の逆数　1／F			0.26	0.52	0.40	0.48	0.36	0.41	0.38	0.37	0.23	0.37	0.33	0.35			

(3) 系列3　1st IS (92/510) (リコンビナント) 緩衝液ベースによる補正係数算出

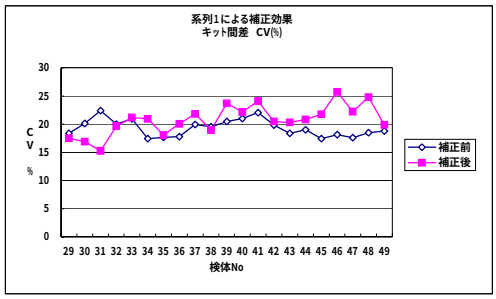
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV
系列 (3)	1st IS 92/510 (リコンビナント) 緩衝液	0	1.76	0.00	0.07	0.10	0.00		0.0	0.00	1.00	0.941		0.13	0.40	0.62	
		2	3.56	4.40	2.74	2.05	2.62	2.5	2.8	2.95	1.73	3.09	2.17	1.62	2.68	0.78	29.1
		5	5.94	10.70	6.39	5.66	6.61	6.3	6.9	7.76	4.13	6.52	5.42	3.48	6.31	1.81	28.6
		20	21.50	33.50	23.97	26.77	26.83	26.0	24.9	32.69	18.21	23.35	22.50	14.0	24.52	5.44	22.2
		50	36.90	93.80	57.18	75.49	63.20	64.1	62.4	57.20	48.03	57.41	59.28	26.0	58.42	17.16	29.4
		100	108.00	158.1	124.00		124.30	126.3	127.0	118.34	99.17	116.30	124.39	82.2	118.92	18.98	16.0
		200	>200					265.2	230.0		191.15			167.7	213.51	42.99	20.1
系列(3)の相関式 レベル1～6		傾き	1.02	1.60	1.23	1.52	1.24	1.26	1.27	1.16	0.99	1.15	1.25	0.79			
		Y切片	-0.52	2.75	-0.45	-1.37	0.63	0.31	-0.01	2.30	-0.47	0.61	-1.44	-1.97			
補正係数F (レベル1～6)			0.99	0.61	0.82	0.67	0.80	0.79	0.79	0.84	1.02	0.86	0.81	1.32			
補正係数の逆数　1／F			1.01	1.64	1.22	1.48	1.25	1.27	1.27	1.19	0.98	1.16	1.23	0.76			

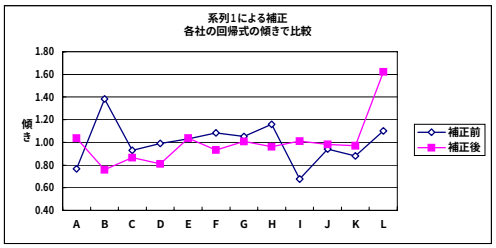
(4) 系列4　1st IS (92/510) (リコンビナント) ヒト血清ベースによる補正係数算出

			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	平均	SD	CV
系列 (4)	1st IS 92/510 (リコンビナント) ヒト血清	0	1.83	0.00	0.07	0.14	0.03	0.0	0.0	0.00	1.00	0.672		0.18	0.36	0.59	
		2	3.71	3.80	2.75	3.03	2.48	2.5	2.9	2.43	1.52	2.91	2.21	2.12	2.69	0.64	23.9
		5	4.96	9.60	6.51	6.05	6.10	6.1	6.7	6.75	3.52	6.33	5.75	4.95	6.11	1.43	23.5
		20	19.70	36.00	23.61	31.14	24.75	25.6	25.3	25.70	16.92	23.84	22.89	20.7	24.68	5.03	20.4
		50	32.40	88.30	58.79	77.52	63.75	65.3	62.0	57.37	46.66	59.42	61.37	53.4	60.52	13.96	23.1
		100	80.70	169.8	119.85		124.23	125.3	130.0	119.87	95.78	101.10	124.78	102.7	117.64	23.19	19.7
		200	>200					259.6	232.0		181.70				224.43	39.50	17.6
系列(4)の相関式 レベル1～6		傾き	0.76	1.70	1.19	1.56	1.25	1.26	1.29	1.19	0.96	1.02	1.25	1.03			
		Y切片	1.34	1.11	0.08	-0.45	0.10	0.30	-0.29	0.33	-0.72	2.28	-0.99	0.24			
補正係数F (レベル1～6)			1.28	0.58	0.84	0.65	0.80	0.79	0.78	0.84	1.05	0.95	0.81	0.97			
補正係数の逆数　1／F			0.78	1.71	1.19	1.55	1.25	1.26	1.29	1.19	0.95	1.05	1.24	1.03			

図表７：実試料系標準物質候補品（系列１）による補正効果

実試料	バイアルID（ラベル）	No.	系列1による補正前			系列1による補正後		
			平均	SD	CV (%)	平均	SD	CV (%)
IVF症例（1～9）	FSH検体-1	29	1.759	0.323	18.3	4.65	0.81	17.5
	FSH検体-2	30	6.862	1.382	20.1	18.04	3.05	16.9
	FSH検体-3	31	12.252	2.744	22.4	31.97	4.87	15.2
	FSH検体-4	32	21.807	4.361	20.0	57.59	11.33	19.7
	FSH検体-5	33	25.366	5.310	20.9	66.91	14.15	21.1
	FSH検体-6	34	31.217	5.433	17.4	83.01	17.37	20.9
	FSH検体-7	35	47.312	8.367	17.7	125.24	22.63	18.1
	FSH検体-8	36	73.257	13.039	17.8	194.33	39.00	20.1
	FSH検体-9	37	117.519	23.436	19.9	311.05	67.90	21.8
産婦人科以外の症例（10～21）	FSH検体-10	38	4.002	0.782	19.5	10.57	2.00	18.9
	FSH検体-11	39	8.411	1.720	20.4	22.29	5.29	23.7
	FSH検体-12	40	16.526	3.467	21.0	43.68	9.69	22.2
	FSH検体-13	41	26.741	5.893	22.0	70.81	17.07	24.1
	FSH検体-14	42	35.931	7.113	19.8	95.08	19.44	20.4
	FSH検体-15	43	47.345	8.693	18.4	125.50	25.45	20.3
	FSH検体-16	44	51.936	9.880	19.0	137.69	28.66	20.8
	FSH検体-17	45	57.083	9.955	17.4	151.79	33.03	21.8
	FSH検体-18	46	67.528	12.240	18.1	180.63	46.45	25.7
	FSH検体-19	47	75.630	13.329	17.6	201.27	44.68	22.2
	FSH検体-20	48	83.546	15.446	18.5	222.77	55.18	24.8
	FSH検体-21	49	132.766	24.907	18.8	351.38	69.80	19.9
			平均CV (%)		19.3	平均CV (%)		20.8

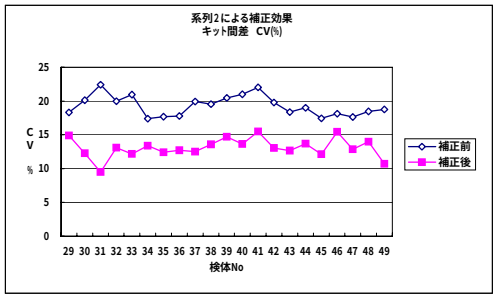


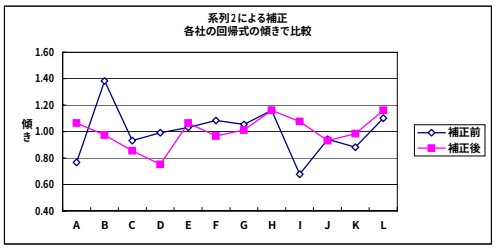


			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
系列1による補正前	実検体の相関	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10
	レベル1～5	切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68
	X:全社平均	r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953
	Y:各社	r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976
系列1による補正後	実検体の相関	傾き	1.04	0.76	0.87	0.81	1.04	0.93	1.01	0.96	1.01	0.98	0.97	1.62
	レベル1～5	切片	-0.37	-1.64	0.90	-2.42	3.30	2.34	-1.32	2.74	-2.11	0.33	0.90	-2.65
	X:全社平均	r2	0.99	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Y:各社	r	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

図表８：実試料系標準物質候補品（系列２）による補正効果

実試料	バイアルID（ラベル）	No.	系列2による補正前			系列2による補正後		
			平均	SD	CV (%)	平均	SD	CV (%)
IVF症例（1～9）	FSH検体-1	29	1.759	0.323	18.3	4.807	0.718	14.932
	FSH検体-2	30	6.862	1.382	20.1	18.629	2.289	12.287
	FSH検体-3	31	12.252	2.744	22.4	32.989	3.132	9.493
	FSH検体-4	32	21.807	4.361	20.0	59.333	7.787	13.125
	FSH検体-5	33	25.366	5.310	20.9	68.777	8.396	12.207
	FSH検体-6	34	31.217	5.433	17.4	85.250	11.441	13.421
	FSH検体-7	35	47.312	8.367	17.7	129.096	16.065	12.444
	FSH検体-8	36	73.257	13.039	17.8	199.919	25.403	12.707
	FSH検体-9	37	117.519	23.436	19.9	319.442	39.960	12.509
産婦人科以外の症例（10～21）	FSH検体-10	38	4.002	0.782	19.5	10.894	1.480	13.583
	FSH検体-11	39	8.411	1.720	20.4	22.860	3.367	14.729
	FSH検体-12	40	16.526	3.467	21.0	44.896	6.123	13.639
	FSH検体-13	41	26.741	5.893	22.0	72.743	11.257	15.475
	FSH検体-14	42	35.931	7.113	19.8	97.882	12.774	13.051
	FSH検体-15	43	47.345	8.693	18.4	129.082	16.383	12.692
	FSH検体-16	44	51.936	9.880	19.0	141.733	19.390	13.681
	FSH検体-17	45	57.083	9.955	17.4	155.714	18.915	12.147
	FSH検体-18	46	67.528	12.240	18.1	184.958	28.595	15.460
	FSH検体-19	47	75.630	13.329	17.6	206.599	26.565	12.858
	FSH検体-20	48	83.546	15.446	18.5	228.172	31.952	14.003
	FSH検体-21	49	132.766	24.907	18.8	361.170	38.705	10.717
			平均CV (%)		19.3	平均CV (%)		13.1

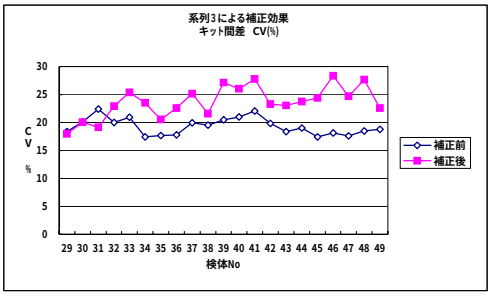


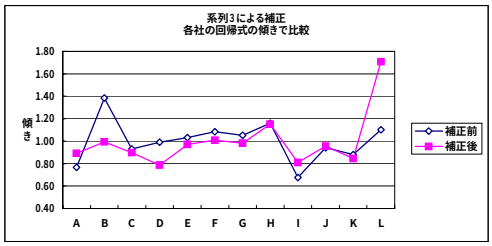


			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
系列2による補正前	実検体の相関	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10
	レベル1～5	切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68
	X:全社平均	r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953
	Y:各社	r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976
系列2による補正後	実検体の相関	傾き	1.06	0.97	0.85	0.75	1.06	0.97	1.01	1.16	1.08	0.93	0.98	1.16
	レベル1～5	切片	-0.48	-2.26	0.84	-2.37	3.38	2.40	-1.45	3.28	-2.40	0.24	0.85	-2.03
	X:全社平均	r2	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Y:各社	r	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

図表９：実試料系標準物質候補品（系列３）による補正効果

実試料	バイアルID（ラベル）	No.	系列3による補正前			系列3による補正後		
			平均	SD	CV (%)	平均	SD	CV (%)
IVF症例（1～9）	FSH検体-1	29	1.759	0.323	18.3	1.482	0.266	17.957
	FSH検体-2	30	6.862	1.382	20.1	5.775	1.159	20.063
	FSH検体-3	31	12.252	2.744	22.4	10.245	1.962	19.151
	FSH検体-4	32	21.807	4.361	20.0	18.435	4.228	22.933
	FSH検体-5	33	25.366	5.310	20.9	21.470	5.452	25.395
	FSH検体-6	34	31.217	5.433	17.4	26.507	6.226	23.487
	FSH検体-7	35	47.312	8.367	17.7	39.991	8.198	20.500
	FSH検体-8	36	73.257	13.039	17.8	62.065	14.027	22.600
	FSH検体-9	37	117.519	23.436	19.9	99.579	25.017	25.123
産婦人科以外の症例（10～21）	FSH検体-10	38	4.002	0.782	19.5	3.379	0.728	21.556
	FSH検体-11	39	8.411	1.720	20.4	7.143	1.937	27.116
	FSH検体-12	40	16.526	3.467	21.0	14.009	3.647	26.033
	FSH検体-13	41	26.741	5.893	22.0	22.710	6.311	27.791
	FSH検体-14	42	35.931	7.113	19.8	30.407	7.082	23.291
	FSH検体-15	43	47.345	8.693	18.4	40.118	9.244	23.043
	FSH検体-16	44	51.936	9.880	19.0	44.043	10.467	23.765
	FSH検体-17	45	57.083	9.955	17.4	48.485	11.810	24.358
	FSH検体-18	46	67.528	12.240	18.1	57.743	16.393	28.389
	FSH検体-19	47	75.630	13.329	17.6	64.294	15.860	24.668
	FSH検体-20	48	83.546	15.446	18.5	71.250	19.698	27.646
	FSH検体-21	49	132.766	24.907	18.8	112.328	25.367	22.583
			平均CV (%)		19.3	平均CV (%)		23.7

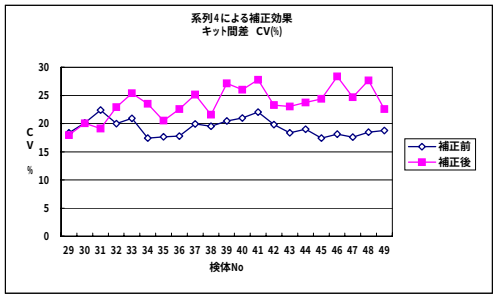


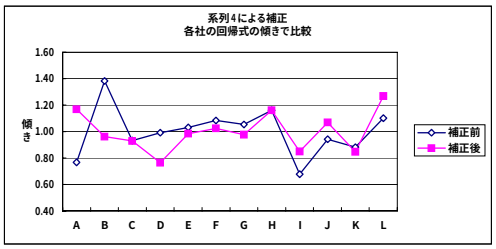


			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
系列3による補正前	実検体の相関 レベル1～5 X:全社平均 Y:各社	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10
		切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68
		r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953
		r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976
系列3による補正後	実検体の相関 レベル1～5 X:全社平均 Y:各社	傾き	0.89	0.99	0.90	0.79	0.97	1.01	0.98	1.15	0.81	0.96	0.84	1.71
		切片	-0.11	-0.70	0.29	-0.76	0.98	0.80	-0.42	1.03	-0.55	0.10	0.24	-0.91
		r2	0.99	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		r	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

図表 10：実試料系標準物質候補品（系列４）による補正効果

実試料	バイアルID（ラベル）	No.	系列4による補正前			系列4による補正後		
			平均	SD	CV (%)	平均	SD	CV (%)
IVF症例（1～9）	FSH検体-1	29	1.759	0.323	18.3	1.482	0.266	17.957
	FSH検体-2	30	6.862	1.382	20.1	5.775	1.159	20.063
	FSH検体-3	31	12.252	2.744	22.4	10.245	1.962	19.151
	FSH検体-4	32	21.807	4.361	20.0	18.435	4.228	22.933
	FSH検体-5	33	25.366	5.310	20.9	21.470	5.452	25.395
	FSH検体-6	34	31.217	5.433	17.4	26.507	6.226	23.487
	FSH検体-7	35	47.312	8.367	17.7	39.991	8.198	20.500
	FSH検体-8	36	73.257	13.039	17.8	62.065	14.027	22.600
	FSH検体-9	37	117.519	23.436	19.9	99.579	25.017	25.123
産婦人科以外の症例（10～21）	FSH検体-10	38	4.002	0.782	19.5	3.379	0.728	21.556
	FSH検体-11	39	8.411	1.720	20.4	7.143	1.937	27.116
	FSH検体-12	40	16.526	3.467	21.0	14.009	3.647	26.033
	FSH検体-13	41	26.741	5.893	22.0	22.710	6.311	27.791
	FSH検体-14	42	35.931	7.113	19.8	30.407	7.082	23.291
	FSH検体-15	43	47.345	8.693	18.4	40.118	9.244	23.043
	FSH検体-16	44	51.936	9.880	19.0	44.043	10.467	23.765
	FSH検体-17	45	57.083	9.955	17.4	48.485	11.810	24.358
	FSH検体-18	46	67.528	12.240	18.1	57.743	16.393	28.389
	FSH検体-19	47	75.630	13.329	17.6	64.294	15.860	24.668
	FSH検体-20	48	83.546	15.446	18.5	71.250	19.698	27.646
	FSH検体-21	49	132.766	24.907	18.8	112.328	25.367	22.583
			平均CV (%)		19.3	平均CV (%)		23.7





			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
系列4による補正前	実検体の相関 レベル1～5 X:全社平均 Y:各社	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10
		切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68
		r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953
		r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976
系列4による補正後	実検体の相関 レベル1～5 X:全社平均 Y:各社	傾き	1.17	0.96	0.93	0.76	0.98	1.02	0.98	1.16	0.85	1.07	0.85	1.27
		切片	-0.17	-0.69	0.27	-0.75	0.96	0.78	-0.44	1.01	-0.59	0.08	0.22	-0.69
		r2	0.99	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		r	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

図表 11：実検体による補正係数算出

実検体測定値より、基準検体を6検体選択

バイアルID（ラベル）	No.	A 測定結果 (mIU/mL)	B 測定結果 (mIU/mL)	C 測定結果 (mIU/mL)	D 測定結果 (mIU/mL)	E 測定結果 (mIU/mL)	F 測定結果 (mIU/mL)	G 測定結果 (mIU/mL)	H 測定結果 (mIU/mL)	I 測定結果 (mIU/mL)	J 測定結果 (mIU/mL)	K 測定結果 (mIU/mL)	L 測定結果 (mIU/mL)
-	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
FSH検体-1	29	1.7	2.4	1.8	1.6	1.8	1.9	2.0	2.0	1.1	1.7	1.6	1.6
FSH検体-2	30	5.3	9.5	7.0	6.3	7.5	7.6	7.4	8.2	4.0	6.6	6.4	6.5
FSH検体-13	41	19.1	38.4	24.0	23.9	30.2	30.2	27.1	32.4	17.8	24.9	22.4	30.5
FSH検体-18	46	55.2	87.6	64.6	58.9	70.1	75.4	70.2	80.9	44.7	64.2	58.9	79.6
FSH検体-21	49	106.0	188.6	125.3	135.7	133.9	141.2	142.0	150.7	87.9	126.1	114.8	141.0

平均 (mIU/mL)	SD (mIU/mL)	CV %
0.00	0.00	
1.76	0.32	18.3
6.86	1.38	20.1
26.74	5.89	22.0
67.53	12.24	18.1
132.77	24.91	18.8

補正係数1：傾きの逆数　　各々の全社平均値に対する各社測定値の相関式から補正係数を算出

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
実検体の相関 全検体 (1-21) X：全社平均 Y：各社	傾き	0.80	1.40	0.95	1.01	1.01	1.07	1.07	1.14	0.66	0.95	0.86	1.08
	切片	-0.31	-0.72	-0.01	-1.79	0.97	0.75	-0.43	0.90	-0.14	-0.05	0.03	0.81
	r2	0.9993	0.9980	0.9998	0.9945	0.9993	0.9993	0.9997	0.9992	1.0000	1.0000	0.9999	0.9969
	r	0.9996	0.9990	0.9999	0.9973	0.9997	0.9997	0.9999	0.9996	1.0000	1.0000	0.9999	0.9984

1.000	0.184	18.4

傾きの逆数（補正係数）	1.25	0.71	1.06	0.99	0.99	0.94	0.94	0.88	1.51	1.05	1.16	0.93

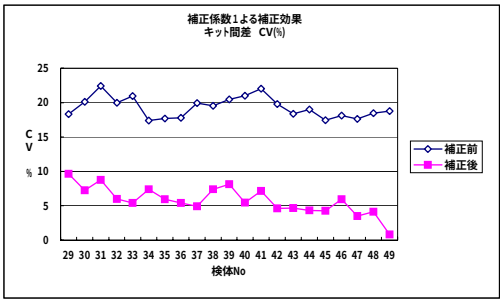
補正係数2：比の逆数　　基準検対の全社平均値と各社測定値の比から補正係数を算出

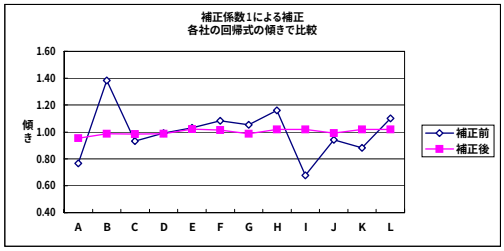
	No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
FSH検体-1	29	1.05	0.73	0.96	1.11	1.00	0.93	0.89	0.86	1.65	1.02	1.09	1.13
FSH検体-2	30	1.28	0.72	0.98	1.09	0.92	0.90	0.93	0.84	1.70	1.04	1.08	1.06
FSH検体-13	41	1.40	0.70	1.12	1.12	0.88	0.89	0.99	0.83	1.50	1.07	1.20	0.88
FSH検体-18	46	1.22	0.77	1.05	1.15	0.96	0.90	0.96	0.83	1.51	1.05	1.15	0.85
FSH検体-21	49	1.25	0.70	1.06	0.98	0.99	0.94	0.93	0.88	1.51	1.05	1.16	0.94
平均		1.24	0.73	1.03	1.09	0.95	0.91	0.94	0.85	1.57	1.05	1.13	0.97

図表 12：実検体（補正係数１）による補正効果

（補正係数1）

実試料	バイアルID（ラベル）	No.	補正前 平均	補正前 SD	補正前 CV (%)	補正後 平均	補正後 SD	補正後 CV (%)
IVF症例 (1～9)	FSH検体-1	29	1.76	0.323	18.3	1.77	0.170	9.636
	FSH検体-2	30	6.86	1.382	20.1	6.85	0.496	7.245
	FSH検体-3	31	12.25	2.744	22.4	12.18	1.071	8.794
	FSH検体-4	32	21.81	4.361	20.0	21.77	1.305	5.994
	FSH検体-5	33	25.37	5.310	20.9	25.27	1.368	5.412
	FSH検体-6	34	31.22	5.433	17.4	31.30	2.313	7.391
	FSH検体-7	35	47.31	8.367	17.7	47.41	2.830	5.968
	FSH検体-8	36	73.26	13.039	17.8	73.40	3.972	5.411
	FSH検体-9	37	117.52	23.436	19.9	117.28	5.749	4.902
産婦人科以外の症例 (10～21)	FSH検体-10	38	4.00	0.782	19.5	4.00	0.297	7.418
	FSH検体-11	39	8.41	1.720	20.4	8.38	0.682	8.129
	FSH検体-12	40	16.53	3.467	21.0	16.46	0.900	5.469
	FSH検体-13	41	26.74	5.893	22.0	26.63	1.909	7.172
	FSH検体-14	42	35.93	7.113	19.8	35.90	1.655	4.612
	FSH検体-15	43	47.34	8.693	18.4	47.37	2.221	4.689
	FSH検体-16	44	51.94	9.880	19.0	51.93	2.251	4.335
	FSH検体-17	45	57.08	9.955	17.4	57.18	2.455	4.294
	FSH検体-18	46	67.53	12.240	18.1	67.64	4.005	5.921
	FSH検体-19	47	75.63	13.329	17.6	75.76	2.640	3.485
	FSH検体-20	48	83.55	15.446	18.5	83.59	3.479	4.162
	FSH検体-21	49	132.77	24.907	18.8	132.71	1.073	0.809
			平均CV (%)		19.3	平均CV (%)		5.8

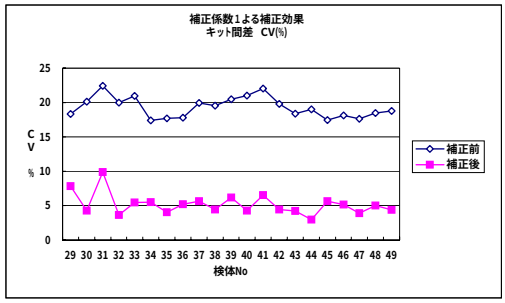


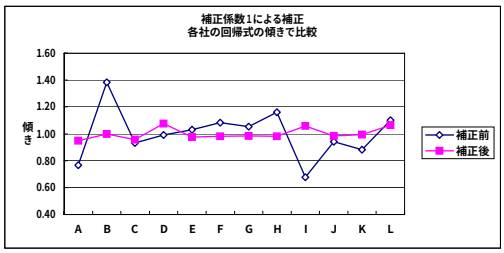


			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
補正前	実検体の相関 レベル1～5 X：全社平均 Y：各社	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10
		切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68
		r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953
		r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976
補正後	実検体の相関 レベル1～5 X：全社平均 Y：各社	傾き	0.95	0.99	0.98	0.99	1.02	1.01	0.99	1.02	1.02	0.99	1.02	1.02
		切片	-0.14	-0.82	0.37	-1.13	1.21	0.94	-0.51	1.08	-0.81	0.11	0.34	-0.63
		r2	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		r	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

図表 13：実検体（補正係数２）による補正効果

実試料	バイアルID（ラベル）	No.	補正前			補正後		
			平均	SD	CV (%)	平均	SD	CV (%)
IVF症例（1～9）	FSH検体-1	29	1.76	0.323	18.3	1.77	0.138	7.824
	FSH検体-2	30	6.86	1.382	20.1	6.86	0.294	4.283
	FSH検体-3	31	12.25	2.744	22.4	12.24	1.211	9.893
	FSH検体-4	32	21.81	4.361	20.0	21.83	0.799	3.659
	FSH検体-5	33	25.37	5.310	20.9	25.37	1.384	5.455
	FSH検体-6	34	31.22	5.433	17.4	31.39	1.730	5.510
	FSH検体-7	35	47.31	8.367	17.7	47.56	1.920	4.037
	FSH検体-8	36	73.26	13.039	17.8	73.69	3.835	5.205
	FSH検体-9	37	117.52	23.436	19.9	117.79	6.685	5.675
産婦人科以外の症例（10～21）	FSH検体-10	38	4.00	0.782	19.5	4.01	0.178	4.441
	FSH検体-11	39	8.41	1.720	20.4	8.41	0.521	6.193
	FSH検体-12	40	16.53	3.467	21.0	16.52	0.712	4.309
	FSH検体-13	41	26.74	5.893	22.0	26.72	1.743	6.522
	FSH検体-14	42	35.93	7.113	19.8	36.04	1.605	4.453
	FSH検体-15	43	47.34	8.693	18.4	47.55	2.007	4.221
	FSH検体-16	44	51.94	9.880	19.0	52.11	1.545	2.964
	FSH検体-17	45	57.08	9.955	17.4	57.45	3.236	5.633
	FSH検体-18	46	67.53	12.240	18.1	67.88	3.514	5.177
	FSH検体-19	47	75.63	13.329	17.6	76.07	2.948	3.875
	FSH検体-20	48	83.55	15.446	18.5	83.95	4.212	5.017
	FSH検体-21	49	132.77	24.907	18.8	133.36	5.830	4.372
			平均CV (%)		19.3	平均CV (%)		5.2





			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
補正前	実検体の相関 レベル1～5 X：全社平均 Y：各社	傾き	0.77	1.38	0.93	0.99	1.03	1.08	1.05	1.16	0.68	0.94	0.88	1.10
		切片	-0.11	-1.17	0.35	-1.14	1.22	1.00	-0.54	1.23	-0.54	0.10	0.29	-0.68
		r2	0.9933	0.9967	0.9990	0.9954	0.9984	0.9985	0.9990	0.9987	0.9992	0.9993	0.9980	0.9953
		r	0.9966	0.9983	0.9995	0.9977	0.9992	0.9992	0.9995	0.9994	0.9996	0.9996	0.9990	0.9976
補正後	実検体の相関 レベル1～5 X：全社平均 Y：各社	傾き	0.95	1.00	0.96	1.07	0.98	0.98	0.98	0.98	1.06	0.98	0.99	1.06
		切片	-0.11	-0.81	0.39	-1.21	1.19	0.94	-0.48	1.07	-0.82	0.14	0.36	-0.63
		r2	0.99	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
		r	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

「資料１」

ＪＣＣＬＳ標準化基本検討委員会　柱１

ワーキンググループ　Ｃ５
(FSH)

実行計画書

2006年　　作成：三菱化学ヤトロン　三好
2007年5月29日　　改訂：東ソー株式会社　塚本

標準化WGにおける作業内容（FSH）

決定事項、作業内容、等	備考
(1) 公的な標準品の入手 ①WHO IS 83/575（ヒト下垂体由来） ②WHO 1st IS 92/510（Recombinant）	 ①80IU/本 ②60IU/本
(2) 抗原の入手（校正用標準品の材料としての抗原候補） 該当なし。	 BiosPacific catalog No.J18020128 Lot# J9144（下垂体由来）、ProSpec-Tany TechnoGene（Recombinant）: HOR-253が候補となったが、現段階ではWHO品に限定し検討することとなった。
(3) 抗原添加用ベースの選定 ③血清ベース：ヒト血清 （LH、FSHフリー） ④緩衝液ベース：50mMトリス塩酸緩衝液、150mM NaCl、1.0% BSA、pH7.4	 ③血清ベースはWG参加メーカーの在庫品を使用（詳細情報は公表しないことが条件） ④緩衝液ベースは、昨年のC9のベースを参考とした。 ③、④LH、FSH共通で使用する。
(4) 評価用実検体の準備 ・調査用の実検体の入手（WG参加メーカー分）、濃度レベルごとに実検体をプールして、21例を作成。	 0-20ng/mL :7検体 21-50ng/mL :7検体 51-200ng/mL :7検体 （検体収集が難しい場合、試験までに集まった検体数で実施する。）
(5) 評価用標準品の準備 ・公的な標準品（①、②）をベース（③、④）に添加した評価用標準サンプルを作成する。	 緩衝液ベースにて理論値0、2、5、20、50、100、200mIU/mlを調製する。 ＊抗原2種Xベース2種＝全4系列にて評価する。
(6) 各社キットでの測定 ・各メーカー標準品でそれぞれ検量線を作成し、(4),(5)の評価サンプルを測定する。	 測定回数、ロット数は、各メーカーで判断する。-->代表値を報告する。 測定レンジ外の高濃度サンプルは、実検体のみ希釈して測定する。
(7) 結果集計 ・測定された値を各メーカー間で比較する。	 ①現状評価：各メーカーの標準品を基準にして測定された実検体の相関性を確認する。 ②校正用標準品として適切なものの判別：検体の測定値を一致させるように、各標準サンプルの測定値を補正し、キット間のバラツキの少ない組合せを判別する。 ③収束性評価：キット間のバラツキが最も少なかった標準サンプルが一致するように、測定値を補正し、実検体での相関性の収束性を評価する。 ④それ以外のデータ解析方法についてはWGで協議して、決定する。

2007.4.18修正

検体調製手順 及び 取り扱い （FSH）

1．標準品、精製品購入

公的標準品	購入量
FSH：IS 83/575（ヒト下垂体由来）［80IU/ampoule］	2本
FSH：1st IS 92/510（Recombinant）［60IU/ampoule］	2本

2．資材の準備

1mL分注可能な凍結保存容器	標準サンプル分	448 本	7濃度 x 4系例 x 16セット（予備3セット含む）
	実検体分	336 本	21サンプル x 16セット（予備3セット含む）

（例：アシスト製凍結保存チューブ 品番：72.694.007S 500本入 25000円） x 2個

フリーズボックス （100穴用）	標準サンプル（28本/箱）	16 箱
	実検体（21本/箱）	16 箱

（例：アシスト製フリーズボックス 品番：95.100A 100穴用 20箱入 17000円）x 2個
※ 標準サンプルと検体を同じ場所で準備する場合には、両方を1箱にまとめることも可。

3．希釈用緩衝液の準備 ＊LH、FSH共通。

組成：50mMトリス塩酸緩衝液、150mM NaCl、1.0% BSA、pH7.4

作成量： 1 L （1項目分の場合は500mlで十分）

調製方法：

1）以下の試薬を用意する。
①2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール（Tris）
②BSA
③塩化ﾅﾄﾘｳﾑ
④塩酸
※各試薬のメーカー、グレードは調製メーカーに一任とする

2） Tris 6.057gを精製水0.8Lに溶解する。
3） 塩化ﾅﾄﾘｳﾑ 8.766gを溶解する。
4） 塩酸を適量添加して、pHを7.3に調整する。
5） 液の回転を停止し、BSA 10gを液面に乗せて溶解する。
6） 溶液を0.95Lにﾒｽｱｯﾌﾟする。
7） 塩酸を適量添加して、pHを7.4に調整する。
8） 溶液を1Lにﾒｽｱｯﾌﾟする。
9） pHを確認する（7.4±0.1）。

4．ヒト血清の準備 ＊LH、FSH共通。

		必要量（1項目分）
購入依頼	ヒト血清 （LH、FSHフリー）	300mL
	（詳細な情報は公表しないことを条件として、WG参加メーカーの在庫品を使用する。）	

5．評価用標準品の調製

上記標準品･精製品を希釈用緩衝液、又はヒト血清で倍々希釈して以下の評価用標準品を調製する

	標準品（下垂体由来）	希釈液
系列1	IS 83/575	緩衝液
系列2	IS 83/575	ヒト血清

	標準品（ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ）	希釈液
系列3	1st IS 92/510	緩衝液
系列4	1st IS 92/510	ヒト血清

（留意事項）

*希釈系列の濃度は、使用した標準品の表示値を採用する。

*希釈は、各溶液の比重を考慮して重量で実施することが望ましいが、困難の場合は容量で実施しても良い。

*調製したサンプルを凍結保存容器に1mLづつ分注する（分注本数は下記の表を参照）。
1本は凍結融解前後の安定性評価に用いるため、液状、4℃保存。
残りは全て、凍結（-80℃）保存する。

確認測定-->協力メーカー　未定

系列1，系列2　　（注）実際に納品された標準品の表示値を確認し、以下の濃度になるように調製する。

IS　83/575（ヒト下垂体由来）　[80IU/本]

濃度(mIU/mL)	10000	200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品	凍乾末	1	9	5	2	2	2	-	
緩衝液(mL)	8	49	9	15	18	18	18	18	緩衝液（計）　153 mL
	8	50	18	20	20	20	20		
残液量	6	**34**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本
濃度(mIU/mL)		200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品		1	9	5	2	2	2	-	
ヒト血清(mL)		49	9	15	18	18	18	18	ヒト血清（計）　145 mL
		50	18	20	20	20	20		
残液量		**34**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本

希釈系列の濃度は、使用した原料の表示値の値を採用する
希釈は、各溶液の比重を考慮して重量で実施することが望ましいが、困難の場合は容量で実施しても良い

系列3，系列4　　（注）実際に納品された標準品の表示値を確認し、以下の濃度になるように調製する。

1st IS 92/510 (Recombinant)　[60IU/本]

濃度(mIU/mL)	10000	200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品	凍乾末	1	9	5	2	2	2	-	
緩衝液(mL)	6	49	9	15	18	18	18	18	緩衝液（計）　151 mL
	6	50	18	20	20	20	20		
残液量	4	**34**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本
濃度(mIU/mL)		200	100	50	20	5	2	0	
標準品･精製品		1	9	5	2	2	2	-	
ヒト血清(mL)		49	9	15	18	18	18	18	ヒト血清（計）　145 mL
		50	18	20	20	20	20		
残液量		**34**	**18**	**18**	**18**	**20**	**20**	**18**	
分注数		16	16	16	16	16	16	16	分注数（計）　112 本

希釈系列の濃度は、使用した原料の表示値の値を採用する
希釈は、各溶液の比重を考慮して重量で実施することが望ましいが、困難の場合は容量で実施しても良い

6. 評価用標準品の分注

凍結保存容器にラベルをはる
調製したサンプルを凍結保存容器に1mLづつ分注する
*1本だけ、液状で4℃保存用のものを確保しておく。

ラベル例:

系1 FSH
200mIU/mL
Lot.xxxxxx

最低必要本数

	200	100	50	20	5	2	0		
メーカー配布用	12	12	12	12	12	12	12	12	} 凍結保存
予備	3	3	3	3	3	3	3	3	
凍結融解確認用	1	1	1	1	1	1	1	1	--> 液状保存
計	16	16	16	16	16	16	16	16	

(注) 残液は、後の有効利用を考えて分注保存しておくことが望ましい。

7. 評価用標準品の凍結融解前後の安定性試験

・凍結融解による濃度変化を確認するため、液状品(4℃保存) 1本、凍結品(-80℃) 1本について、FSHを測定する。
・測定試薬は1キットでよい。協力メーカーに送付して測定する。(未定)
・液状での安定性を考慮して、作成から測定まではできるだけ短期間に実施することが適切。

8. 評価用実検体の準備

以下の種別の検体 各16mL分を JCCLSに依頼し、入手する

	FSH検体
0-20mIU/mL	7検体
21-50mIU/mL	7検体
51-200ng/mL	7検体

9. 評価用実検体の分注

凍結保存容器にラベルをはる
実検体を凍結保存容器に1mLづつ分注する

最低必要本数

	200	
メーカー配布用	12	} 凍結保存
予備	3	
計	15	

(注) 残液は、後の有効利用を考えて分注保存しておくことが望ましい。

10. 評価用標準品、評価用実検体の保存、発送

・分注の終了した評価用標準品、評価用実検体は、各メーカーごとにフリーズボックスに入れて、－80℃で保存する
・予備分の評価用標準品、評価用実検体、及び分注残も－80℃で保存する
・ただし、凍結融解前後の評価に用いる、評価用標準品の1ml分のみは冷蔵(4℃) 保存する。
・評価用標準品、評価用実検体を発送する場合は、ドライアイスを手配して、凍結状態で発送する

JCCLS標準化基本検討委員会　柱1　ワーキンググループ　C5 [FSH]
評価用検体測定結果報告書

会社名　　担当者

試薬名

測定原理

□ RIA (ラジオイムノアッセイ)　□ EIA (酵素免疫測定法)
□ FIA (蛍光免疫測定法)　□ FEIA (蛍光酵素免疫測定法)
□ CLIA (化学発光免疫測定法)　□ CLEIA (化学発光酵素免疫測定法)
□ ECLIA (電気化学発光免疫測定法)　□ その他

測定機器

測定単位

ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰの単位

検体希釈液

較正結果

標準品	表示値	ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰ
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

多重測定した場合の測定結果は、各メーカーによって平均値、中央値等を判断して代表値を記入してください。

評価用検体測定結果 (FSH)

No.	検体	測定結果	ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰ	希釈の有無	希釈倍数	その他
1	系列1　0[mIU/mL]			□有 □無		
2	2			□有 □無		
3	5			□有 □無		
4	20			□有 □無		
5	50			□有 □無		
6	100			□有 □無		
7	200			□有 □無		
8	系列2　0[mIU/mL]			□有 □無		
9	2			□有 □無		
10	5			□有 □無		
11	20			□有 □無		
12	50			□有 □無		
13	100			□有 □無		
14	200			□有 □無		
15	系列3　0[mIU/mL]			□有 □無		
16	2			□有 □無		
17	5			□有 □無		
18	20			□有 □無		
19	50			□有 □無		
20	100			□有 □無		
21	200			□有 □無		
22	系列4　0[mIU/mL]			□有 □無		
23	2			□有 □無		
24	5			□有 □無		
25	20			□有 □無		
26	50			□有 □無		
27	100			□有 □無		
28	200			□有 □無		

No.	検体	測定結果	ｵﾘｼﾞﾅﾙﾃﾞｰﾀｰ	希釈の有無	希釈倍数	その他
29	実検体　1			□有 □無		
30	2			□有 □無		
31	3			□有 □無		
32	4			□有 □無		
33	5			□有 □無		
34	6			□有 □無		
35	7			□有 □無		

2-4-2-5　エストラジオール（　E2)

要旨

1）エストラジオール（E2）の測定について、実試料系標準物質によるデータ統一化の可能性とその時の問題点に関する調査および実試料系標準物質候補品を調製・使用したキット間のデータ標準化の検証を行うことを目的とした調査研究を実施した。

2）キットを販売しているメーカーを中心にワーキンググループ（WG）を設け、キット、キャリブレータ、トレーサビリティ等の調査を実施した。エストラジオールに関しては、各企業は日本公定書協会標準品、米国薬局方（USP)、高純度合成品等の高純度標準物質または IRMM を直近上位標準としたトレーサビリティ体系となっていることがわかった。

3）キットの互換性および実試料系標準物質候補品を使用した場合の測定値収束性の調査を目的とした検討では、現状でもキット間の相関係数は良好であり、大きく乖離する検体はなかったが、回帰式の傾きに差異が確認された。実試料系標準物質候補品を各キットの共通キャリブレータとした場合でも、キット間による回帰式の傾きの差異は解消されず、人工的に調製した実試料系標準物質では測定値の統一化は困難であることが確認された。

4）一方、ID-LC/MS（同位体希釈-液体クロマトグラフ/質量分析法）で値付けしたヒトプール血清（抗原未添加）を共通のキャリブレータとした場合では、回帰式の傾きは収束し、測定値の統一化が可能であることが示された。また、ID-LC/MS で値付けされた実試料標準物質（抗原添加）を最上位として、ID-LC/MS 測定値を良く伝達している複数の市販キットによる共同実験によってヒトプール血清（抗原未添加）を値付けしても同様に測定値の統一化は可能であることが示された。

5）ヒトプール血清を標準物質に用いる方法は、血清の条件や性状、保存方法等、解決すべき課題も多い。

1．目的

本調査研究項目群、C5-WG（プロラクチン（PRL)、E2、LH、FSH、プロゲステロン、テストステロン）内の E2 について、「実試料系標準物質候補品を調製・使用し、各社キットのデータの標準化について検証を行う」ことが本調査研究の目的である。

2．委員会の構成

本委員会は、調査研究項目群の柱１C5-WG で、メンバーの構成を下記に記す。なお WG 発足以降、メンバーの入れ替わりがあったため、下表は 19 年度報告書作成時のメンバーとした。

	氏名	所属
アドバイザー	家入　蒼生夫	獨協医科大学
アドバイザー	小田桐　恵美	東京女子医科大学

	氏名	所属
アドバイザー	桑　克彦	筑波大学
アドバイザー	森下　芳孝	名古屋大学
アドバイザー	谷　渉	検査医学標準物質機構（ReCCS） （旧名:HECTEF スタンダードレファレンスセンター）
責任者	塚本　久雄	東ソー株式会社
運営管理者	大和　隆	協和メデックス株式会社
実験項目担当者(FSH)	伊東　立雄	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社
実験項目担当者(LH)	御子柴　浩	オリンパス株式会社
実験項目担当者(LH)	誉田 大仁	三洋化成工業株式会社
実験項目担当者(FSH)	前田 英征	株式会社テイエフビー
実験項目担当者(E2)	伊東　理絵	ベックマン・コールター株式会社
実験項目担当者(E2)	山崎　智之	日水製薬株式会社
技術担当者	髙　瑛姫	アボットジャパン株式会社
技術担当者	齋藤　憲祐	デイド　ベーリング株式会社
技術担当者	坂本　純一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	梅田　和之	富士レビオ株式会社
技術担当者	三好　欣也	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	松本　幹雄	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

３．委員会の開催

第１回会合：2005/11/15（火）14：00～16：15　（臨薬協会議室）
第２回会合：2005/12/02（金）10：00～12：30　（臨薬協会議室）
第３回会合：2006/01/12（木）13：00～17：30　（臨薬協会議室）
第４回会合：2006/02/14（火）13：30～17：00　（臨薬協会議室）
第５回会合：2006/03/23（木）13：30～17：30　（臨薬協会議室）
第６回会合：2006/04/25（火）13：30～17：30　（臨薬協会議室）
第７回会合：2007/09/25（月）14：00～18：00　（臨薬協会議室）
第８回会合：2007/01/16（火）14：00～17：30　（臨薬協会議室）
第９回会合：2007/02/20（火）13：30～16：30　（臨薬協会議室）
第 10 回会合：2007/04/04（水）14：00～16：00　（臨薬協会議室）
第 11 回会合：2008/01/25（金）13：30～17：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

4－1 測定値の互換性の現状

1）平成 18 年度調査・試験結果

各企業は日本公定書協会標準品、米国薬局方（USP)、高純度合成品等の高純度標準物質または IRMM を直近上位標準としたトレーサビリティ体系となっており、性能確認用のリファレンスマテリアルとしては IRMM から供給される BCR576、577、578 が広く用いられていた。

また、2005 年度に実施された、「第 27 回イムノアッセイ検査全国コントロールサーベイ（2005 年）成績報告書」によると、RI 法が 9 施設と non-RI 法 50 施設の合わせて 59 施設の参加があった。キット内の変動係数 CV（%）は、試料 1、試料 2 ともに 11.8%であった。キット間の CV は 51～68%と大きかった。

平成 18 年度の本試験では、キャリブレータとして各メーカー指定のキャリブレータ、IRMM および実試料系標準物質候補品（E2 フリーヒト血清に日本公定書協会標準品を添加）を用いて実血清検体の測定値の収束性を評価した。その結果、現状で相関係数は良好であり、大きく乖離する検体はなかったが、キット間によって回帰式の傾きに差異が確認された。また、実試料系標準物質候補品を各キットの共通キャリブレータとした場合でも、キット間による回帰式の傾きは解消されず、人工的に調製した実試料系標準物質では、測定値の統一化は困難であることが確認された。一方、基準測定操作法の候補としては ID-LC/MS が挙げられるが、BCR576、578 の回収率試験では十分な回収率が得られなかったため、別の施設でも ID-LC/MS による確認を行い、BCR の表示値に問題が無いか、ID-LC/MS の測定に問題が無いかを検証することが課題として残された。

2）現状把握のための試験（本試験）

平成 19 年度の本試験では、平成 18 年度の試験で使用した標準物質候補品と実血清検体を HECTEF スタンダードレファレンスセンター（現在の検査医学標準物質機構）（以下、ReCCS と記載）にて ID-LC/MS 法で測定し、値の確認およびキット間の測定値の収束性を検証した。既に平成 18 年度の試験において標準物質候補品の表示値あるいはキット平均値を基準にした場合は、測定値の収束はしないことが分かっているため、今年度は主に ReCCS の ID-LC/MS 測定値を基準に測定値収束の可能性を探った。なお、今年度の試験では ReCCS の ID-LC/MS の他に 10 種類の市販キット（キット A～J）を対象とした。

なお、検討に用いた実血清検体は、「JCCLS 標準化基本検討委員会　柱１：臨床検査用標準物質の研究開発」で測定するヒト検体についての見解（2006 年 1 月 10 日)」に従って配布した。

①検体の安定性確認（プレテスト）

平成 19 年度の試験を行うにあたり、平成 18 年度の試験で調製、凍結保存された標準品候補品と実血清検体の保存安定性を確認した。代表的なキットとしてキット B、F、I で凍結保

存されたサンプルを測定し、平成 18 年度の測定値と比較した（表１）。

表１　凍結保存されたサンプルの保存安定性

No.			キットB			キットF			キットI			3社平均
			平成18年度測定値	平成19年度測定値	前年度比	平成18年度測定値	平成19年度測定値	前年度比	平成18年度測定値	平成19年度測定値	前年度比	前年度比
実試料系	1	系列1　0 [pg/mL]	<L	<L	---	<20.0	<20.0	---	25.5	22.2	87.0%	87.0%
標準物質	2	30	36.1	32.1	89.0%	43.8	32.5	74.1%	64.0	55.6	86.9%	83.3%
候補品	3	100	106.3	104.2	98.0%	112.0	107.0	95.5%	155.2	140.8	90.7%	94.8%
	4	500	542.1	539.6	99.5%	558.0	531.0	95.2%	798.7	755.9	94.6%	96.4%
	5	1500	1568.4	1557.6	99.3%	1441.0	1535.0	106.5%	2073.5	2027.5	97.8%	101.2%
IRMM	6	系列2(凍結乾燥品)	---	44.4	103.0%	---	29.7	101.7%	---	37.1	88.0%	97.6%
	9	系列2(溶解品)	43.1	47.8	110.9%	29.2	26.9	92.1%	42.1	36.9	87.7%	96.9%
	10	系列3(溶解品)	162.1	170.1	104.9%	161.0	161.5	100.3%	197.0	188.6	95.7%	100.3%
	11	系列4(溶解品)	300.2	313.5	104.4%	349.0	328.0	94.0%	432.0	406.9	94.2%	97.5%
実血清検体	12	実検体 1	21.2	21.3	100.6%	24.0	23.7	98.8%	17.1	15.2	88.8%	96.0%
	13	実検体 2	37.2	35.9	96.6%	37.0	40.0	108.0%	27.9	24.9	89.3%	98.0%
	14	実検体 4	73.4	77.9	106.0%	72.5	77.6	107.0%	71.0	66.5	93.6%	102.2%
	15	実検体 7	112.5	113.5	100.9%	103.0	118.5	115.0%	135.5	128.9	95.1%	103.7%
	16	実検体 8	53.7	55.2	102.7%	227.0	179.5	79.1%	38.2	31.8	83.2%	88.3%
	17	実検体 9	137.0	144.0	105.2%	142.0	145.5	102.5%	169.9	172.2	101.4%	103.0%
	19	実検体 11	192.7	185.1	96.0%	198.0	201.0	101.5%	240.8	230.1	95.5%	97.7%
	20	実検体 14	291.6	307.7	105.5%	298.0	296.5	99.5%	379.8	367.6	96.8%	100.6%
	21	実検体 17	318.1	309.5	97.3%	358.0	335.0	93.6%	409.5	400.4	97.8%	96.2%
	23	実検体 21	542.0	508.0	93.7%	549.0	607.0	110.6%	730.4	709.3	97.1%	100.5%
	24	実検体 22	567.8	564.0	99.3%	664.0	686.5	103.4%	800.1	777.2	97.1%	99.9%
	25	実検体 24	936.7	960.7	102.6%	1022.0	1030.0	100.8%	1231.5	1191.0	96.7%	100.0%
	26	実検体 25	940.2	932.6	99.2%	1031.0	1202.0	116.6%	1223.0	1153.0	94.3%	103.4%
	27	実検体 26	933.2	943.3	101.1%	945.0	1010.5	106.9%	1225.0	1152.5	94.1%	100.7%
	29	実検体 28	1629.6	1733.2	106.4%	1783.0	1863.0	104.5%	2269.0	2110.0	93.0%	101.3%
	30	実検体 29	1742.9	1744.8	100.1%	1722.0	1951.0	113.3%	2305.0	2204.0	95.6%	103.0%

※No.6の前年度比は、No.9の平成18年度測定値を基準とした
※前年度比で10%以上乖離しているものに網掛け

実検体平均 (n=16)　99.7%

	IRMM標準品	表示値	
系列2	BCR576	0.114 nmol/L	31.1 pg/mL
系列3	BCR577	0.689 nmol/L	188.0 pg/mL
系列4	BCR578	1.34 nmol/L	365.0 pg/mL

どのサンプルも概ね去年と同じ測定値が得られることを確認した。ただし実試料系標準物質候補品の 30 pg/mL と実検体 8 は複数キットで前年度比が約 80 %という結果で、凍結保存中の経時変化が疑われた。IRMM に関しては、溶解品よりも凍乾品の方が平成 18 年度の測定結果に近い値が得られたが、溶解品も大きな測定値の低下は認められなかった。ただし、標準物質の特性上、凍乾品の測定値を優先した方が良いと思われる。実検体については、実検体 8 以外でも濃度の低い検体の前年度比がごくわずかに低い傾向にあったものの、その変化は数パーセントであり、同一キットの平成 18 年度と 19 年度の測定結果の相関性にほとんど変化はなく（図１）、キット間の相関性についても大きく変化することはないことが確認された（表２）。

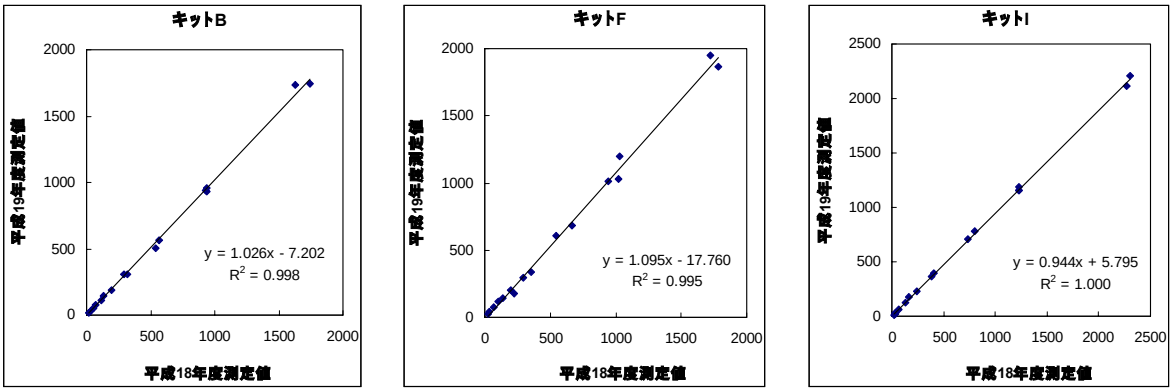


図１　同一キットの平成 18 年度と平成 19 年度の測定結果の相関性

表２　キット間相関性

			Y軸					
			キットB		キットF		キットI	
			平成18年度	平成19年度	平成18年度	平成19年度	平成18年度	平成19年度
X軸	キットA	傾き	0.908	0.934	0.935	1.028	1.237	1.166
	平成18年度	Y切片	51.43	44.38	77.38	65.25	48.79	52.38
		相関係数	0.997	0.998	0.994	0.995	0.997	0.996
	キットC	傾き	0.703	0.726	0.736	0.805	0.957	0.900
	平成18年度	Y切片	24.55	12.82	31.34	19.39	13.33	23.21
		相関係数	0.996	0.998	0.997	0.993	0.997	0.996
	キットD	傾き	0.604	0.620	0.621	0.682	0.822	0.776
	平成18年度	Y切片	26.47	19.46	52.64	37.79	14.94	19.83
		相関係数	0.999	0.999	0.994	0.995	0.999	0.999
	キットE	傾き	0.918	0.942	0.943	1.037	1.249	1.178
	平成18年度	Y切片	10.03	2.63	35.93	19.01	-7.22	-0.98
		相関係数	0.999	0.999	0.994	0.996	0.999	0.999
	キットG	傾き	1.076	1.105	1.107	1.215	1.465	1.383
	平成18年度	Y切片	-11.26	-19.46	13.19	-4.50	-36.76	-28.85
		相関係数	0.998	0.998	0.994	0.994	0.999	0.998
	キットH	傾き	0.773	0.793	0.794	0.874	1.052	0.993
	平成18年度	Y切片	9.78	2.93	35.68	18.74	-7.51	-1.62
		相関係数	1.000	0.998	0.994	0.996	0.999	1.000

従って平成 19 年度の試験・解析については、公平を期すため平成 19 年度のデータしかない ID-LC/MS およびキット J を除き、全て平成 18 年度のデータを使用することとした。なお、実試料系標準物質候補品の 30 pg/mL と実検体 8 は経変による値の低下が疑われるため、平成 19 年度の評価からは除外し、ID-LC/MS の IRMM 測定値は凍乾品のものを採用した。

②ID-LC/MS による測定

平成 18 年度の検討では、BCR576、578 を ID-LC/MS で測定したところ、表示値に対する回収率が低かったため、別の施設として ReCCS に ID-LC/MS による測定を依頼した。その結果、ID-GC/MS で値付けされた表示値と ReCCS での ID-LC/MS 測定値は、3 濃度とも±2%以内となりいずれも表示値（認証値）の不確かさの範囲内で一致した（表３）。

表３　ReCCS における IRMM の ID-LC/MS 測定値

検体			表示値 [pg/mL]	測定値 [pg/mL]			回収率
				1回目	2回目	平均	
IRMM	系列2(凍結乾燥品)	BCR576	31.1	31.1	30.4	30.8	98.9%
	系列3(凍結乾燥品)	BCR577	188.0	195.0	187.7	191.3	101.8%
	系列4(凍結乾燥品)	BCR578	365.0	373.0	366.2	369.6	101.3%

③標準物質候補品の回収率検討

ReCCS の ID-LC/MS 測定値に対する各キットの回収率を検討した。実試料系標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値に対する回収率は各キット平均で 88～96 %と概ね ID-LC/MS 測定値と一致したが、特に低濃度域でキット間のばらつきが大きかった。IRMM の ID-LC/MS 測定値に対する回収率は BCR576 が 14 1%、BCR577 が 91 %、BCR578 が 97 %で、特に BCR576 でキット間のばらつきが大きかった（表４、図２）。

表４　標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値に対する回収率

検体			表示値 [pg/mL]	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	平均
実試料系標準物質候補品	系列1		30 [pg/mlL]	32%	80%		49%	93%	97%	63%	130%	141%	106%	88%
			100	47%	82%		70%	98%	87%	69%	116%	120%	99%	88%
			500	65%	88%	81%	104%	93%	90%	69%	130%	129%	106%	96%
			1500	64%	85%	99%	103%	87%	78%	67%	111%	113%	91%	90%
IRMM	系列2(溶解品)	BCR576	31.1 [pg/mlL]	115%	140%	113%	128%	144%	95%	294%	131%	137%	115%	141%
	系列3(溶解品)	BCR577	188.0	76%	85%	75%	94%	97%	84%	115%	97%	103%	87%	91%
	系列4(溶解品)	BCR578	365.0	61%	81%	63%	90%	91%	94%	71%	110%	117%	88%	87%

空欄はキットの検出感度以下

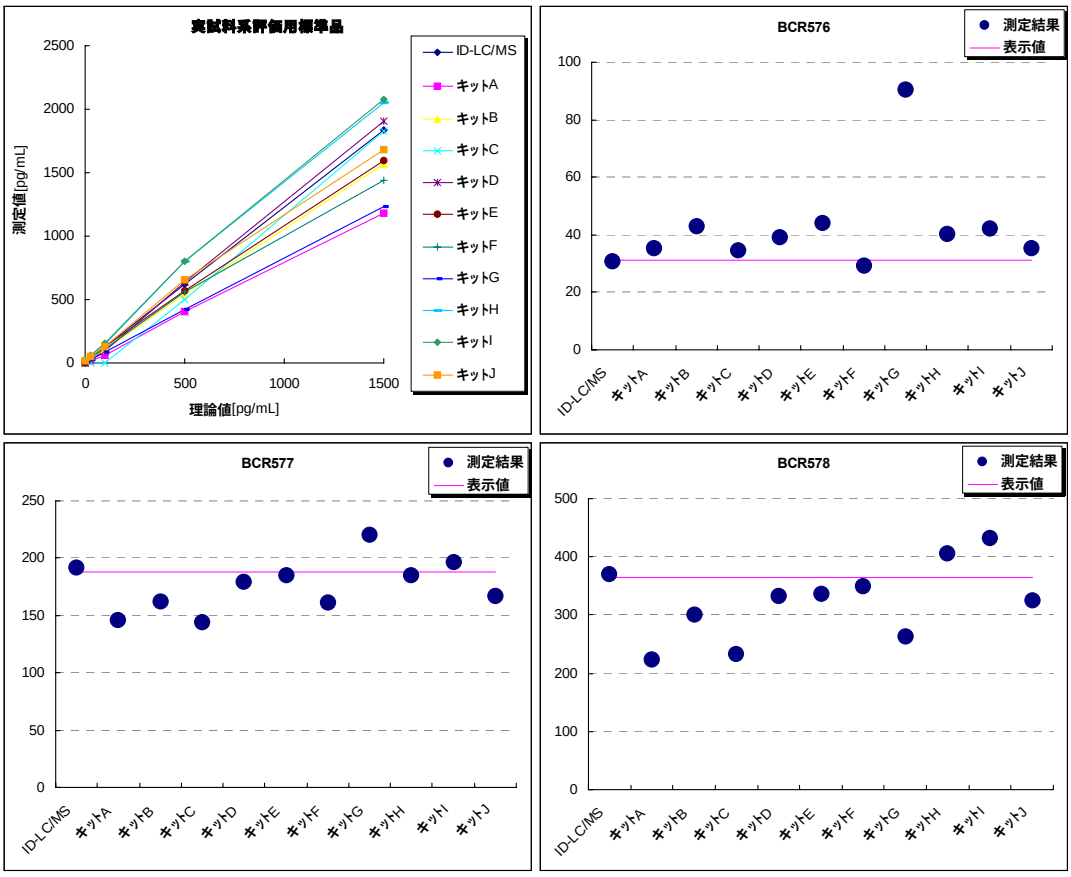


図２　標準物質候補品の各キット測定値と ID-LC/MS 測定値の比較

④実血清検体のキット測定値と ID-LC/MS 測定値の相関性検討

各キットの測定プロトコルに従い、各キット指定のキャリブレータでキャリブレーションして測定した実血清検体と、ID-LC/MS 測定値の相関性を評価した。その結果、ID-LC/MS に対する相関係数はどのキットも 0.996 以上と良好であったが、回帰式の傾きは 0.561～1.772 とキットによって異なっており、全検体を対照としたキット間の CV 平均は 18.4 %であった。(表５、６、図３)。

表５　実血清検体測定結果（メーカー測定値）

No.	検体	ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	平均	CV
9	実検体 1	11.1	12.0	21.2	<20.0	22.2	22.0	24.0	23.1	13.3	17.1	12.0	17.8	29.5%
10	2	23.8	22.7	37.2	<20.0	37.6	39.1	37.0	33.8	23.0	27.9	18.5	30.1	25.6%
12	4	68.1	44.5	73.4	77.7	71.8	68.4	72.5	65.5	67.3	71.0	59.0	67.2	13.3%
15	7	127.5	79.7	112.5	133.8	132.3	135.8	103.0	117.5	128.2	135.5	104.0	119.1	15.0%
17	9	177.9	112.6	137.0	155.5	188.3	158.5	142.0	151.8	169.7	169.9	145.5	155.3	13.6%
19	11	226.0	159.8	192.7	241.1	306.4	201.9	198.0	215.4	233.1	240.8	191.0	218.8	17.5%
22	14	335.9	238.2	291.6	331.7	469.0	310.1	298.0	266.1	380.0	379.8	296.5	327.0	19.5%
25	17	345.1	291.0	318.1	466.7	504.5	328.1	358.0	379.3	410.1	409.5	323.5	375.8	17.6%
29	21	650.3	483.4	542.0	670.9	830.5	551.2	549.0	505.4	704.7	730.4	567.5	616.9	17.6%
30	22	728.1	511.7	567.8	745.1	905.4	609.3	664.0	541.8	782.5	800.1	650.5	682.4	17.8%
32	24	1235.4	917.3	936.7	1376.0	1484.1	948.1	1022.0	848.7	1183.0	1231.5	1025.0	1109.8	18.5%
33	25	1263.5	940.9	940.2	1284.0	1471.4	968.0	1031.0	826.6	1205.0	1223.0	999.0	1104.8	17.7%
34	26	1219.3	910.3	933.2	1365.0	1404.4	980.8	945.0	851.7	1188.0	1225.0	938.5	1087.4	18.1%
36	28	2364.3	1848.5	1629.6	2382.0	2730.7	1805.9	1783.0	1587.9	2095.0	2269.0	2024.0	2047.3	17.5%
37	29	2428.6	1858.2	1742.9	2283.0	2846.4	1920.7	1722.0	1612.9	2224.5	2305.0	2103.5	2095.2	17.6%
													CV平均	18.4%

表6　キット間の相関性（メーカー測定値）

		Y軸										
		ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ
X軸	ID-LC/MS		0.771	0.699	0.979	1.155	0.763	0.730	0.648	0.900	0.950	0.848
			-14.13	43.21	44.17	30.65	33.03	51.11	50.86	48.04	39.54	-2.62
			0.999	0.998	0.996	0.999	0.999	0.996	0.998	0.998	0.999	0.998
	キットA	1.295		0.904	1.262	1.496	0.988	0.945	0.840	1.164	1.229	1.098
		19.17		57.05	70.57	52.80	47.73	65.53	62.97	66.07	58.09	13.20
		0.999		0.997	0.995	0.999	0.999	0.995	0.998	0.996	0.998	0.999
	キットB	1.427	1.100		1.412	1.651	1.090	1.044	0.927	1.289	1.358	1.209
		-59.37	-59.38		-28.68	-39.38	-13.01	6.35	11.40	-7.91	-18.45	-52.45
		0.998	0.997		0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	0.996
	キットC	1.012	0.785	0.703		1.165	0.769	0.736	0.651	0.903	0.956	0.856
		-37.08	-49.11	25.06		-5.55	10.73	31.87	37.01	28.79	14.01	-32.91
		0.996	0.995	0.996		0.995	0.994	0.997	0.996	0.995	0.997	0.991
	キットD	0.864	0.666	0.605	0.850		0.660	0.632	0.561	0.779	0.822	0.733
		-25.13	-33.51	24.83	13.24		13.31	31.77	33.51	23.99	14.52	-24.59
		0.999	0.999	0.999	0.995		0.999	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999
	キットE	1.308	1.009	0.915	1.286	1.513		0.955	0.850	1.180	1.244	1.110
		-42.16	-46.57	13.12	-3.32	-18.88		20.50	22.73	8.99	-1.22	-38.84
		0.999	0.999	0.999	0.994	0.999		0.995	0.998	0.999	0.999	0.999
	キットF	1.360	1.048	0.952	1.352	1.573	1.037		0.884	1.228	1.295	1.151
		-64.04	-63.03	-2.88	-38.45	-44.99	-15.68		8.02	-12.30	-23.77	-56.24
		0.996	0.995	0.997	0.997	0.997	0.995		0.996	0.998	0.998	0.994
	キットG	1.535	1.185	1.074	1.524	1.777	1.173	1.124		1.385	1.461	1.303
		-74.43	-71.96	-9.85	-49.00	-57.35	-24.76	-4.74		-20.87	-33.04	-66.57
		0.998	0.998	0.998	0.996	0.999	0.998	0.996		0.998	0.999	0.997
	キットH	1.106	0.852	0.775	1.097	1.280	0.845	0.810	0.719		1.054	0.937
		-49.75	-51.77	6.54	-23.59	-28.72	-5.89	12.65	17.28		-10.02	-44.58
		0.998	0.996	1.000	0.995	0.999	0.999	0.998	0.998		0.999	0.996
	キットI	1.050	0.810	0.735	1.039	1.215	0.802	0.769	0.682	0.948		0.890
		-39.57	-44.34	14.42	-8.50	-16.48	2.25	20.37	23.98	10.27		-36.27
		0.999	0.998	0.999	0.997	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999		0.997
	キットJ	1.176	0.908	0.821	1.147	1.360	0.898	0.858	0.764	1.059	1.117	
		5.32	-10.42	47.31	53.73	35.92	36.68	55.52	53.71	53.03	44.47	
		0.998	0.999	0.996	0.991	0.999	0.999	0.994	0.997	0.996	0.997	

※傾きが0.8~1.2以外を網掛け

1段目：**傾き**
2段目：**Y切片**
3段目：**相関係数**

傾き最大 1.777　　**傾き最小** 0.561

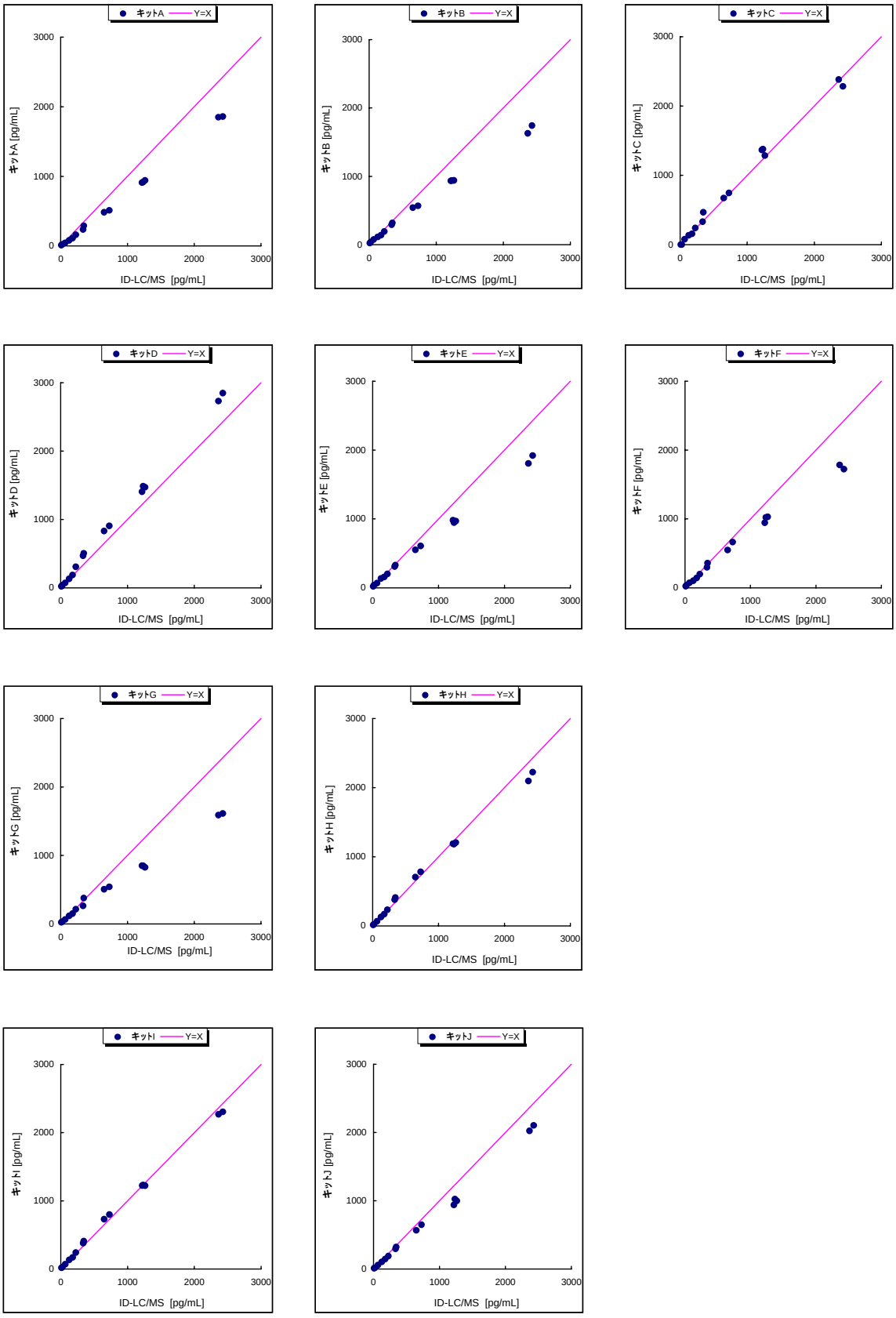


図３　キット間の相関性（メーカー測定値）

⑤実試料系標準物質候補品で補正した場合の相関性検討

実試料系標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値を共通のキャリブレータとして各キットの測定値を補正し、傾きの収束性を評価した。その結果、ID-LC/MS に対する相関性は補正前と変わらず良好であったが、回帰式の傾きは 0.658～1.507、全検体を対象としたキット間の CV 平均も 16.1 %と依然大きいままであった。（表７、８、図４）。

表７　実試料系標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値で補正した実血清検体測定結果

No.	検体	ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	平均	CV
9	実検体 1	11.1	18.7	24.8	<20.0	21.5	25.2	30.2	34.4	11.7	14.9	13.0	20.5	39.2%
10	2	23.8	35.5	43.5	<20.0	36.4	44.8	46.5	50.3	20.3	24.4	20.0	34.5	33.6%
12	4	68.1	69.5	85.9	79.6	69.6	78.3	91.1	97.4	59.4	62.1	63.7	75.0	16.7%
15	7	127.5	124.5	131.6	137.1	128.1	155.5	129.4	174.8	113.1	118.4	112.2	132.0	14.0%
17	9	177.9	175.8	160.2	159.3	182.4	181.6	178.4	225.8	149.8	148.5	157.0	172.4	12.6%
19	11	226.0	249.6	225.4	247.0	296.8	231.3	248.8	320.4	205.7	210.4	206.1	242.5	15.2%
22	14	335.9	371.9	341.1	339.8	454.3	355.2	374.5	395.8	335.4	331.9	320.0	359.6	10.7%
25	17	345.1	454.4	372.1	478.1	488.7	375.8	449.9	564.2	361.9	357.9	349.1	417.9	17.4%
29	21	650.3	754.9	634.0	687.3	804.5	631.4	689.9	751.7	622.0	638.4	612.5	679.7	9.5%
30	22	728.1	799.1	664.2	763.3	877.0	697.9	834.4	805.9	690.7	699.2	702.0	751.1	9.2%
32	24	1235.4	1432.4	1095.7	1409.7	1437.5	1086.0	1284.3	1262.4	1044.1	1076.3	1106.2	1224.6	12.4%
33	25	1263.5	1469.3	1099.7	1315.4	1425.3	1108.8	1295.6	1229.5	1063.6	1068.9	1078.2	1219.8	12.0%
34	26	1219.3	1421.5	1091.6	1398.4	1360.4	1123.4	1187.6	1266.8	1048.6	1070.7	1012.9	1200.1	12.1%
36	28	2364.3	2886.7	1906.2	2440.3	2645.0	2068.5	2240.7	2361.8	1849.1	1983.1	2184.4	2266.4	14.0%
37	29	2428.6	2901.9	2038.8	2338.9	2757.1	2200.0	2164.0	2399.0	1963.4	2014.6	2270.2	2316.0	12.9%
													CV平均	16.1%

表８　実試料系標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値で補正したキット間の相関性

		Y軸										
		ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ
X軸	ID-LC/MS		1.205	0.817	1.003	1.119	0.874	0.918	0.964	0.795	0.830	0.915
			-22.06	50.55	45.25	29.69	37.83	64.23	75.65	42.40	34.56	-2.82
			0.999	0.998	0.996	0.999	0.999	0.996	0.998	0.998	0.999	0.998
	キットA	0.829		0.677	0.828	0.928	0.725	0.760	0.800	0.658	0.688	0.759
		19.17		66.73	72.29	51.14	54.67	82.35	93.66	58.31	50.77	14.25
		0.999		0.997	0.995	0.999	0.999	0.995	0.998	0.996	0.998	0.999
	キットB	1.220	1.468		1.237	1.367	1.068	1.122	1.179	0.973	1.015	1.115
		-59.37	-92.73		-29.38	-38.14	-14.90	7.98	16.96	-6.99	-16.13	-56.61
		0.998	0.997		0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	0.996
	キットC	0.988	1.196	0.803		1.102	0.859	0.903	0.945	0.778	0.816	0.902
		-37.08	-76.69	29.31		-5.38	12.29	40.05	55.05	25.41	12.24	-35.52
		0.996	0.995	0.996		0.995	0.994	0.997	0.996	0.995	0.997	0.991
	キットD	0.892	1.074	0.730	0.899		0.781	0.820	0.862	0.710	0.742	0.817
		-25.13	-52.33	29.04	13.57		15.25	39.93	49.84	21.17	12.69	-26.54
		0.999	0.999	0.999	0.995		0.999	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999
	キットE	1.142	1.376	0.934	1.150	1.279		1.048	1.103	0.909	0.949	1.046
		-42.16	-72.72	15.34	-3.40	-18.29		25.76	33.82	7.93	-1.07	-41.91
		0.999	0.999	0.999	0.994	0.999		0.995	0.998	0.999	0.999	0.999
	キットF	1.082	1.302	0.886	1.102	1.213	0.946		1.046	0.863	0.901	0.989
		-64.04	-98.44	-3.37	-39.39	-43.58	-17.96		11.94	-10.86	-20.78	-60.69
		0.996	0.995	0.997	0.997	0.997	0.995		0.996	0.998	0.998	0.994
	キットG	1.032	1.244	0.845	1.050	1.157	0.904	0.949		0.822	0.859	0.945
		-74.43	-112.38	-11.52	-50.20	-55.55	-28.36	-5.95		-18.42	-28.88	-71.85
		0.998	0.998	0.998	0.996	0.999	0.998	0.996		0.998	0.999	0.997
	キットH	1.253	1.507	1.027	1.274	1.405	1.097	1.154	1.211		1.043	1.146
		-49.75	-80.85	7.65	-24.17	-27.81	-6.74	15.89	25.70		-8.75	-48.12
		0.998	0.996	1.000	0.995	0.999	0.999	0.998	0.998		0.999	0.996
	キットI	1.201	1.447	0.984	1.217	1.347	1.051	1.106	1.161	0.958		1.099
		-39.57	-69.25	16.87	-8.70	-15.96	2.58	25.60	35.66	9.06		-39.15
		0.999	0.998	0.999	0.997	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999		0.997
	キットJ	1.090	1.314	0.890	1.089	1.221	0.954	0.999	1.052	0.866	0.905	
		5.32	-16.27	55.33	55.04	34.79	42.01	69.77	79.89	46.80	38.87	
		0.998	0.999	0.996	0.991	0.999	0.999	0.994	0.997	0.996	0.997	

※傾きが0.8~1.2以外を網掛け

1段目：傾き
2段目：Y切片
3段目：相関係数

傾き最大 1.507　　傾き最小 0.658

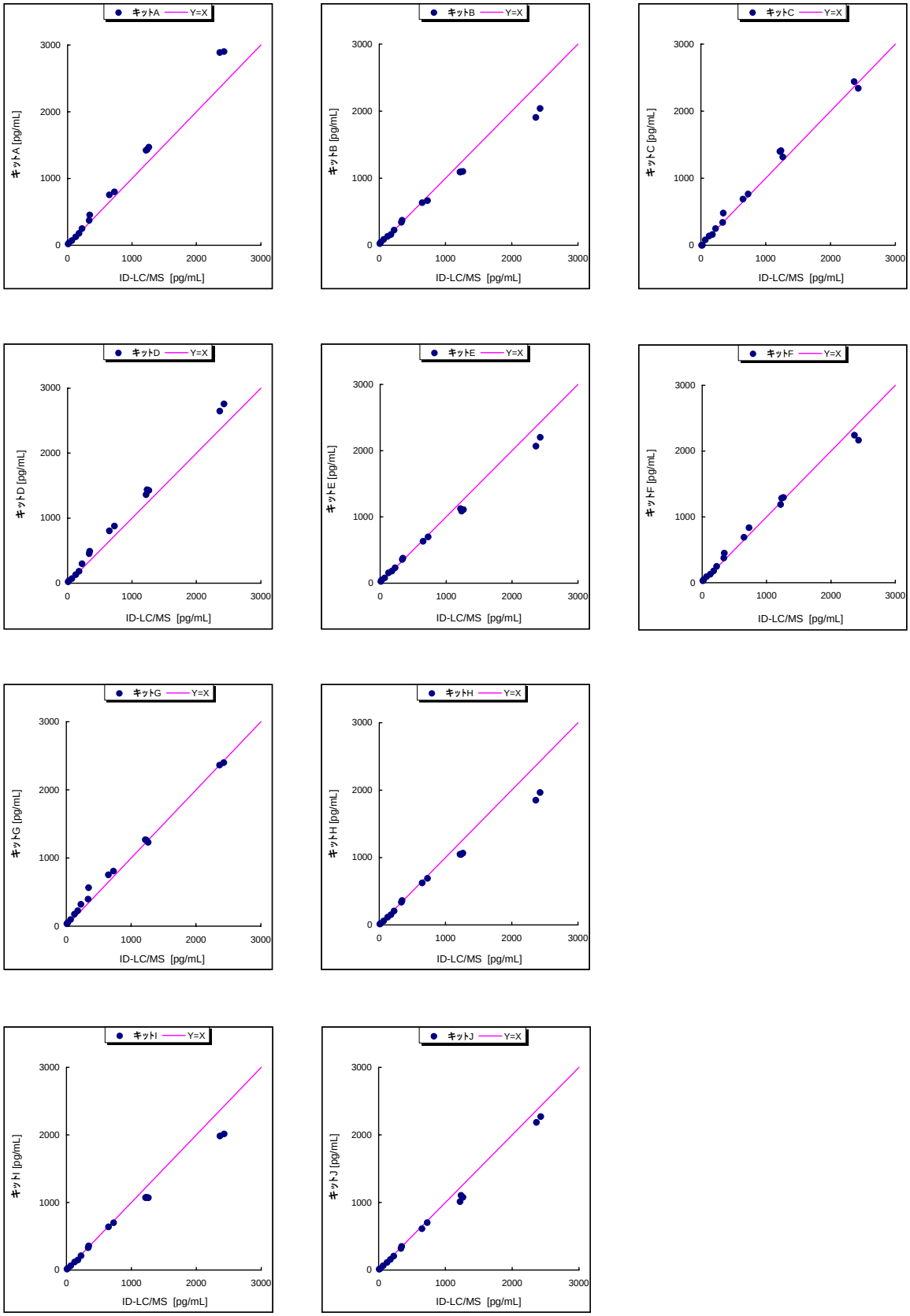


図４　実試料系標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値で補正したキット間の相関性

⑥IRMM で補正した場合の相関性検討

IRMM の ID-LC/MS 測定値を共通のキャリブレータとして各キットの測定値を補正し、傾きの収束性を評価した。その結果、ID-LC/MS に対する相関性は補正前と変わらず良好であったが、回帰式の傾きは 0.526～1.889 と補正前よりも拡大し、全検体を対象としたキット間の CV 平均も 22.6 %と悪化する結果であった。（表９、10、図５）。

表９　IRMM の ID-LC/MS 測定値で補正した実血清検体測定結果

No.	検体	ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	平均	CV
9	実検体 1	11.1	18.7	25.7	<20	24.4	23.8	26.0	28.3	12.4	15.0	13.6	19.9	32.5%
10	2	23.8	35.4	45.2	<20	41.3	42.2	40.1	41.4	21.4	24.5	21.0	33.6	29.1%
12	4	68.1	69.4	89.3	117.7	79.0	73.9	78.6	80.3	62.6	62.2	67.0	77.1	20.5%
15	7	127.5	124.3	136.8	202.6	145.5	146.7	111.6	144.0	119.3	118.7	118.2	135.9	18.6%
17	9	177.9	175.5	166.5	235.5	207.1	171.2	153.9	186.0	158.0	148.9	165.3	176.9	14.3%
19	11	226.0	249.2	234.2	365.1	337.0	218.1	214.6	264.0	217.0	210.9	217.1	250.3	21.1%
22	14	335.9	371.3	354.4	502.4	515.8	335.0	323.0	326.1	353.7	332.8	337.0	371.6	18.7%
25	17	345.1	453.7	386.6	706.8	554.8	354.4	388.0	464.9	381.7	358.8	367.6	432.9	25.5%
29	21	650.3	753.7	658.9	1016.1	913.4	595.4	595.0	619.4	656.0	640.0	644.9	703.9	19.5%
30	22	728.1	797.8	690.2	1128.5	995.7	658.1	719.6	664.0	728.4	701.0	739.2	777.3	19.1%
32	24	1235.4	1430.1	1138.7	2084.0	1632.1	1024.1	1107.6	1040.1	1101.2	1079.0	1164.8	1276.1	25.4%
33	25	1263.5	1467.0	1142.8	1944.6	1618.2	1045.6	1117.4	1013.0	1121.6	1071.6	1135.3	1267.3	23.0%
34	26	1219.3	1419.2	1134.4	2067.3	1544.5	1059.4	1024.2	1043.8	1105.8	1073.3	1066.5	1250.7	25.4%
36	28	2364.3	2882.0	1980.9	3607.6	3003.0	1950.6	1932.4	1946.1	1950.1	1988.1	2300.1	2355.0	24.1%
37	29	2428.6	2897.2	2118.6	3457.6	3130.3	2074.6	1866.3	1976.7	2070.6	2019.6	2390.5	2402.8	22.0%
													CV平均	22.6%

表 10　IRMM の ID-LC/MS 測定値で補正したキット間の相関性

		Y軸										
		ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ
X軸	ID-LC/MS		1.203	0.849	1.483	1.271	0.824	0.791	0.795	0.838	0.832	0.963
			-22.03	52.53	66.90	33.71	35.67	55.40	62.33	44.72	34.65	-2.97
			0.999	0.998	0.996	0.999	0.999	0.996	0.998	0.998	0.999	0.998
	キットA	0.831		0.705	1.226	1.055	0.685	0.657	0.660	0.695	0.691	0.801
		19.17		69.35	106.88	58.06	51.55	71.02	77.18	61.50	50.90	15.00
		0.999		0.997	0.995	0.999	0.999	0.995	0.998	0.996	0.998	0.999
	キットB	1.174	1.411		1.759	1.494	0.969	0.931	0.935	0.987	0.979	1.130
		-59.37	-92.58		-43.43	-43.30	-14.05	6.88	13.97	-7.37	-16.17	-59.60
		0.998	0.997		0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	0.996
	キットC	0.668	0.808	0.564		0.846	0.548	0.527	0.526	0.555	0.553	0.642
		-37.08	-76.56	30.46		-6.10	11.59	34.54	45.36	26.80	12.27	-37.40
		0.996	0.995	0.996		0.995	0.994	0.997	0.996	0.995	0.997	0.991
	キットD	0.786	0.945	0.668	1.170		0.648	0.623	0.626	0.660	0.655	0.758
		-25.13	-52.25	30.18	20.06		14.38	34.43	41.07	22.33	12.73	-27.94
		0.999	0.999	0.999	0.995		0.999	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999
	キットE	1.211	1.456	1.030	1.803	1.540		0.958	0.964	1.016	1.009	1.168
		-42.16	-72.60	15.94	-5.03	-20.76		22.21	27.86	8.37	-1.07	-44.14
		0.999	0.999	0.999	0.994	0.999		0.995	0.998	0.999	0.999	0.999
	キットF	1.254	1.507	1.068	1.889	1.597	1.034		0.999	1.055	1.047	1.207
		-64.04	-98.28	-3.51	-58.23	-49.48	-16.93		9.83	-11.45	-20.83	-63.91
		0.996	0.995	0.997	0.997	0.997	0.995		0.996	0.998	0.998	0.994
	キットG	1.252	1.507	1.066	1.884	1.595	1.034	0.994		1.052	1.045	1.208
		-74.43	-112.20	-11.97	-74.21	-63.07	-26.74	-5.13		-19.42	-28.95	-75.66
		0.998	0.998	0.998	0.996	0.999	0.998	0.996		0.998	0.999	0.997
	キットH	1.188	1.427	1.012	1.785	1.513	0.981	0.944	0.946		0.992	1.144
		-49.75	-80.72	7.94	-35.73	-31.58	-6.36	13.71	21.18		-8.78	-50.67
		0.998	0.996	1.000	0.995	0.999	0.999	0.998	0.998		0.999	0.996
	キットI	1.198	1.441	1.020	1.795	1.525	0.989	0.952	0.955	1.007		1.155
		-39.57	-69.14	17.53	-12.87	-18.12	2.43	22.08	29.38	9.56		-41.22
		0.999	0.998	0.999	0.997	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999		0.997
	キットJ	1.035	1.246	0.878	1.529	1.316	0.854	0.818	0.823	0.867	0.862	
		5.32	-16.25	57.50	81.37	39.50	39.62	60.17	65.83	49.36	38.96	
		0.998	0.999	0.996	0.991	0.999	0.999	0.994	0.997	0.996	0.997	

※傾きが0.8~1.2以外を網掛け

1段目：傾き
2段目：Y切片
3段目：相関係数

傾き最大 1.889　　**傾き最小** 0.526

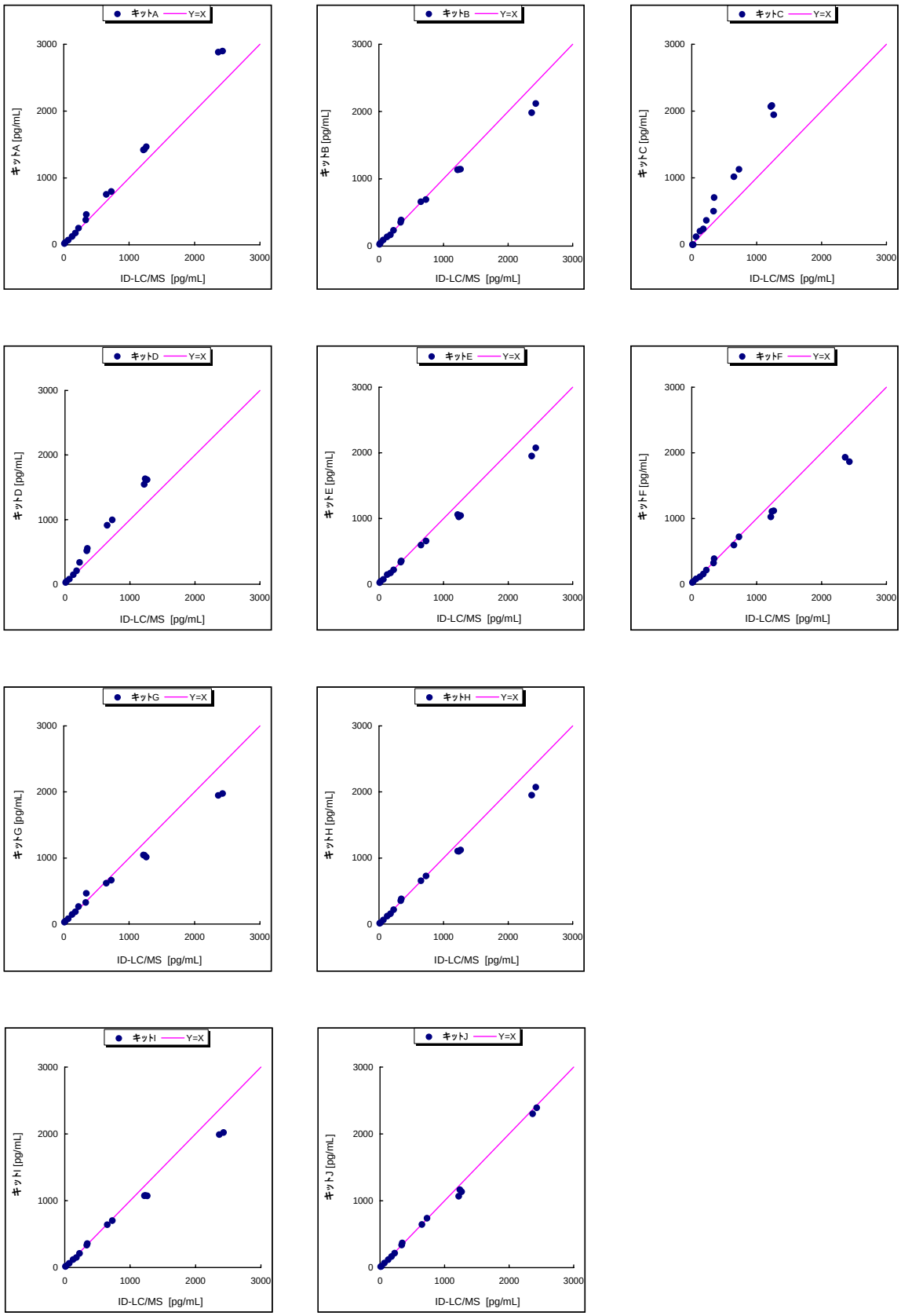


図５　IRMM の ID-LC/MS 測定値で補正したキット間の相関性

⑦実血清検体の ID-LC/MS 測定値で補正した場合の相関性検討

実試料系標準物質候補品や IRMM を共通のキャリブレータとした場合では各キットの相関の傾きは収束しないことが判明したので、評価に用いた実血清検体の中から 3 検体を選択し、その ID-LC/MS 測定値を共通のキャリブレータとして各キットの測定値を補正し、傾きの収束性を評価した。補正に用いる 3 検体は低、中、高濃度域から 1 検体ずつ、キット間のばらつきが少ないものを選択した（表 11）。

表 11　実血清検体の ID-LC/MS 測定値に対する各キットの回収率

No.	検体	ID-LC/MS 測定値 [pg/mL]	ID-LC/MS測定値に対する回収率									SD	補正に使用
			キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	
9	実検体 1	11.1	-215%	42%		51%	53%	41%	40%	23%	34%	177%	1.02	
10	2	23.8	538%	62%		65%	76%	54%	51%	33%	45%	105%	1.60	
12	4	68.1	116%	81%	70%	66%	80%	72%	69%	62%	68%	107%	0.18	○
15	7	127.5	95%	85%	79%	74%	104%	71%	88%	79%	84%	99%	0.11	
17	9	177.9	91%	82%	71%	80%	94%	78%	91%	81%	81%	98%	0.08	
19	11	226.0	100%	96%	91%	105%	98%	92%	109%	93%	95%	101%	0.06	
22	14	335.9	97%	105%	89%	112%	107%	101%	99%	108%	106%	105%	0.07	○
25	17	345.1	115%	112%	122%	118%	111%	118%	138%	114%	111%	112%	0.08	
29	21	650.3	99%	109%	99%	106%	104%	104%	107%	111%	111%	103%	0.04	
30	22	728.1	93%	103%	98%	104%	103%	114%	104%	111%	109%	106%	0.06	
32	24	1,235.4	98%	103%	110%	102%	97%	107%	100%	102%	102%	98%	0.04	
33	25	1,263.5	98%	102%	100%	99%	97%	106%	95%	102%	99%	94%	0.04	
34	26	1,219.3	98%	104%	110%	98%	102%	100%	101%	104%	102%	91%	0.05	
36	28	2,364.3	102%	96%	101%	99%	98%	100%	100%	96%	99%	101%	0.02	○
37	29	2,428.6	100%	100%	94%	100%	102%	94%	99%	100%	98%	102%	0.03	

回収率 ＝ メーカー測定値÷(ID-LC/MS測定値×a+b)
ただし、a=ID-LC/MS**との相関回帰式傾き、**b=ID-LC/MS**とのY切片**

この 3 検体の ID-LC/MS 測定値で補正した結果、ID-LC/MS に対する相関性はこれまで同様良好であり、さらに回帰式の傾きは 0.950～1.048 と収束した。また全検体を対象としたキット間の CV 平均も 13.2 %と改善され、特に高濃度検体の CV の改善が顕著であった。（表 12、13、図６）。

表 12　実血清検体の ID-LC/MS 測定値で補正した実血清検体測定結果

No.	検体	ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	平均	CV
9	実検体 1	11.1	15.4	30.5	<20	19.1	28.7	31.7	34.3	14.9	17.8	14.0	21.7	39.5%
10	2	23.8	29.1	53.6	<20	32.4	51.0	48.9	50.1	25.8	29.0	21.6	36.5	34.9%
12	4	68.1	57.1	106.0	77.1	61.9	89.2	95.8	97.1	75.5	73.8	68.9	79.1	19.9%
15	7	127.5	102.2	162.4	132.8	114.1	177.0	136.1	174.3	143.8	140.7	121.4	139.3	17.2%
17	9	177.9	144.3	197.6	154.4	162.4	206.6	187.6	225.1	190.5	176.4	169.9	181.1	13.0%
19	11	226.0	204.9	278.0	239.4	264.2	263.2	261.6	319.5	261.6	250.0	223.0	253.8	12.2%
22	14	335.9	305.2	420.7	329.3	404.4	404.2	393.7	394.7	426.5	394.3	346.1	377.7	10.9%
25	17	345.1	372.9	458.9	463.4	435.1	427.7	472.9	562.6	460.2	425.2	377.7	436.5	13.6%
29	21	650.3	619.5	782.0	666.1	716.2	718.5	725.2	749.6	790.9	758.3	662.5	712.7	7.9%
30	22	728.1	655.8	819.2	739.8	780.8	794.2	877.1	803.6	878.2	830.7	759.4	787.9	8.4%
32	24	1235.4	1175.6	1351.5	1366.2	1279.8	1235.9	1350.1	1258.8	1327.7	1278.6	1196.6	1277.8	5.1%
33	25	1263.5	1205.8	1356.5	1274.8	1268.9	1261.8	1361.9	1226.0	1352.4	1269.8	1166.2	1273.4	4.9%
34	26	1219.3	1166.6	1346.5	1355.3	1211.1	1278.5	1248.3	1263.2	1333.3	1271.9	1095.6	1253.6	6.3%
36	28	2364.3	2369.0	2351.2	2365.0	2354.8	2354.0	2355.3	2355.1	2351.2	2355.8	2362.8	2358.1	0.3%
37	29	2428.6	2381.5	2514.7	2266.7	2454.6	2503.7	2274.7	2392.2	2496.5	2393.2	2455.6	2414.7	3.5%

CV平均 13.2%

表 13　実血清検体の ID-LC/MS 測定値で補正したキット間の相関性

		Y軸									
		ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ
X軸	ID-LC/MS		0.989	1.008	0.972	0.996	0.995	0.965	0.962	1.010	0.986	0.989
			-18.10	62.35	43.86	26.43	43.05	67.52	75.44	53.92	41.05	-3.05
			0.999	0.998	0.996	0.999	0.999	0.996	0.998	0.998	0.999	0.998
	キットA	1.010		1.018	0.978	1.007	1.005	0.974	0.972	1.020	0.996	1.000
		19.17		82.31	70.06	45.53	62.22	86.56	93.40	74.15	60.31	15.41
		0.999		0.997	0.995	0.999	0.999	0.995	0.998	0.996	0.998	0.999
	キットB	0.989	0.977		0.972	0.987	0.985	0.956	0.953	1.003	0.977	0.978
		-59.37	-76.10		-28.47	-33.96	-16.96	8.39	16.91	-8.88	-19.16	-61.23
		0.998	0.997		0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	0.996
	キットC	1.019	1.013	1.021		1.012	1.009	0.979	0.972	1.021	1.000	1.007
		-37.08	-62.94	36.15		-4.79	13.98	42.10	54.89	32.31	14.54	-38.42
		0.996	0.995	0.996		0.995	0.994	0.997	0.996	0.995	0.997	0.991
	キットD	1.002	0.990	1.011	0.978		0.998	0.968	0.965	1.014	0.990	0.992
		-25.13	-42.95	35.82	13.15		17.35	41.97	49.70	26.92	15.08	-28.71
		0.999	0.999	0.999	0.995		0.999	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999
	キットE	1.004	0.992	1.013	0.979	1.001		0.968	0.967	1.016	0.991	0.994
		-42.16	-59.68	18.93	-3.30	-16.28		27.08	33.72	10.09	-1.27	-45.34
		0.999	0.999	0.999	0.994	0.999		0.995	0.998	0.999	0.999	0.999
	キットF	1.029	1.017	1.040	1.016	1.027	1.024		0.992	1.044	1.018	1.017
		-64.04	-80.78	-4.16	-38.17	-38.80	-20.44		11.90	-13.80	-24.68	-65.65
		0.996	0.995	0.997	0.997	0.997	0.995		0.996	0.998	0.998	0.994
	キットG	1.035	1.024	1.045	1.020	1.033	1.031	1.001		1.048	1.023	1.025
		-74.43	-92.23	-14.21	-48.65	-49.46	-32.27	-6.26		-23.42	-34.31	-77.72
		0.998	0.998	0.998	0.996	0.999	0.998	0.996		0.998	0.999	0.997
	キットH	0.985	0.973	0.997	0.971	0.984	0.982	0.954	0.950		0.975	0.975
		-49.75	-66.35	9.43	-23.42	-24.76	-7.67	16.70	25.63		-10.40	-52.05
		0.998	0.996	1.000	0.995	0.999	0.999	0.998	0.998		0.999	0.996
	キットI	1.011	0.999	1.022	0.993	1.009	1.007	0.979	0.975	1.025		1.001
		-39.57	-56.83	20.81	-8.43	-14.21	2.93	26.91	35.56	11.52		-42.34
		0.999	0.998	0.999	0.997	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999		0.997
	キットJ	1.008	0.997	1.015	0.976	1.005	1.003	0.971	0.970	1.018	0.994	
		5.32	-13.35	68.25	53.34	30.98	47.81	73.34	79.67	59.51	46.17	
		0.998	0.999	0.996	0.991	0.999	0.999	0.994	0.997	0.996	0.997	

※傾きが0.8~1.2以外を網掛け

1段目：傾き
2段目：Y切片
3段目：相関係数

傾き最大 1.048　　**傾き最小** 0.950

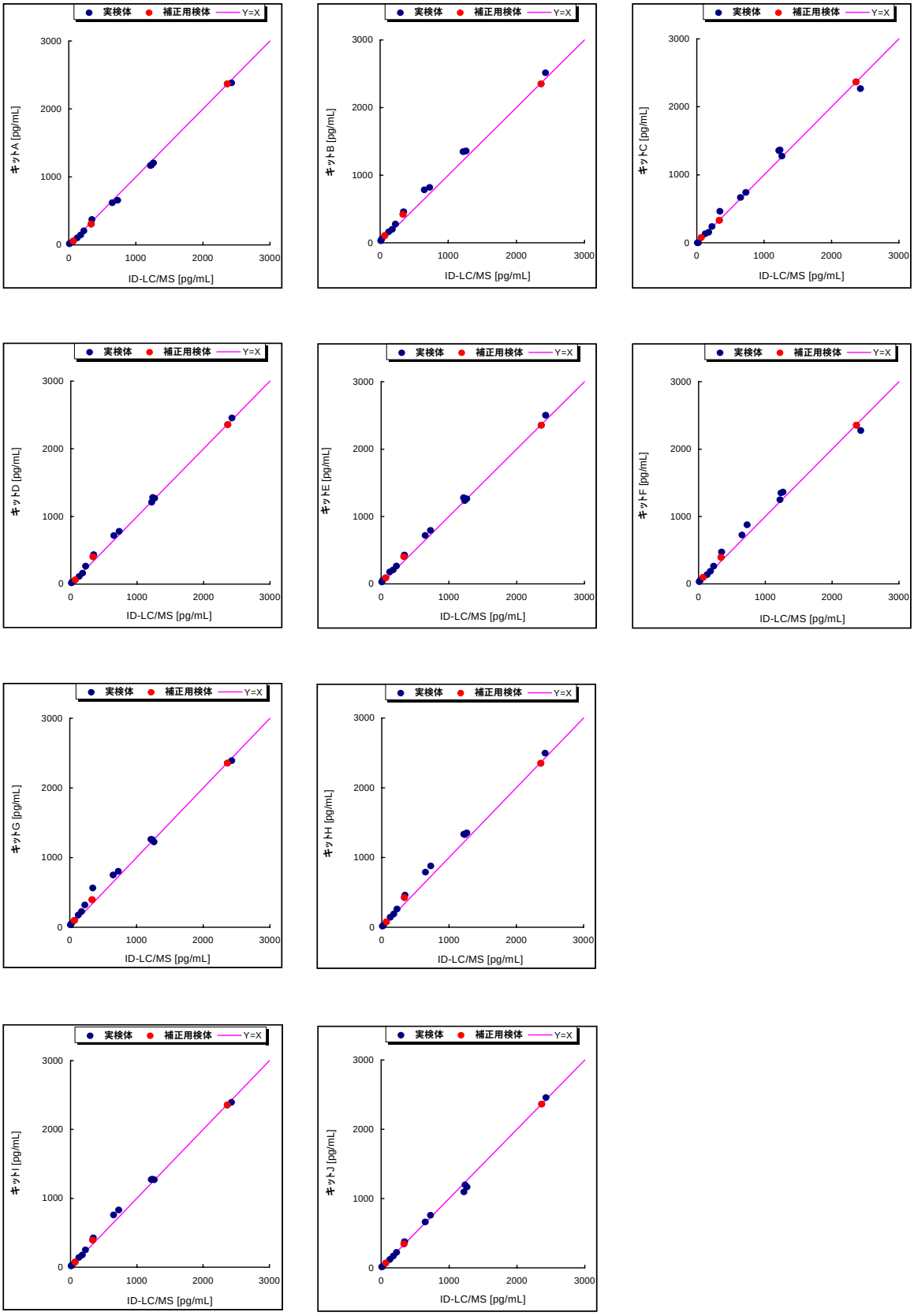


図６　実血清検体の ID-LC/MS 測定値で補正したキット間の相関性

⑧実血清検体の基準キット測定値で補正した場合の相関性検討

実血清検体の ID-LC/MS 測定値で各キットを補正した場合、キット間の相関回帰式の傾きが収束することが分かった。そこで、実試料系標準物質候補品の ID-LC/MS 測定値を良く伝達しているキットを複数選択、それらを基準キットとし（表 14）、⑦の補正に使用した実血清検体 3 検体の基準キット測定平均値（表 15）で各キットの測定値を補正した場合の傾きの収束性を評価した。ID-LC/MS 測定値を良く伝達しているキットとして、実試料系標準物質候補品で補正した場合の ID-LC/MS に対する相関回帰式の傾きが 1.0 に近い、キット F、G、J を選択した。

表 14　実試料系標準物質候補品で補正した場合の ID-LC/MS に対する相関性

	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ
傾き	1.205	0.820	1.005	1.141	0.873	0.923	0.966	0.795	0.832	0.915
Y切片	-22.84	51.47	35.30	51.16	42.21	71.67	75.40	43.76	38.13	-2.82
相関係数	0.999	0.998	0.996	0.982	0.999	0.995	0.998	0.998	0.998	0.998
基準キット						○	○			○

キットCは測定範囲が狭いため除外

表 15　3 検体の基準キット測定平均値

No.	検体	キットF	キットG	キットJ	平均
12	実検体　4	91.1	97.4	63.7	84.1
22	14	374.5	395.8	320.0	363.4
36	28	2240.7	2361.8	2184.4	2262.3

この 3 検体の基準キット測定平均値で補正した結果、ID-LC/MS に対する相関性はこれまで同様良好であり、回帰式の傾きは 0.923～1.079 と ID-LC/MS 測定値で各キットを補正した場合と同等の収束性を示した。また全検体を対象としたキット間の CV 平均も 13.0 %と ID-LC/MS 測定値で補正した場合と同等であった。（表 16、17、図 7）。

表 16　実血清検体の基準キット測定平均値で補正した実血清検体測定結果

No.	検体	ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ	平均	CV
9	実検体　1	11.1	14.8	29.3	<20	18.4	27.5	30.4	32.9	14.3	17.0	13.4	20.9	39.1%
10	2	23.8	28.0	51.4	<20	31.1	48.9	46.9	48.1	24.8	27.8	20.7	35.1	34.5%
12	4	68.1	54.8	101.6	74.1	59.4	85.5	91.9	93.2	72.5	70.8	66.1	76.2	19.6%
15	7	127.5	98.1	155.7	127.5	109.4	169.8	130.5	167.2	138.0	135.0	116.5	134.1	17.0%
17	9	177.9	138.5	189.5	148.2	155.8	198.2	180.0	216.0	182.7	169.3	163.0	174.5	13.0%
19	11	226.0	196.7	266.7	229.8	253.5	252.5	250.9	306.5	250.9	239.8	214.0	244.3	11.8%
22	14	335.9	293.1	403.5	316.1	388.0	387.8	377.7	378.6	409.1	378.4	332.2	363.7	10.5%
25	17	345.1	358.1	440.2	444.8	417.4	410.3	453.7	539.7	441.4	407.9	362.5	420.1	13.0%
29	21	650.3	594.9	750.1	639.4	687.2	689.3	695.8	719.2	758.6	727.6	635.9	686.2	7.5%
30	22	728.1	629.7	785.8	710.1	749.1	761.9	841.5	771.0	842.4	797.0	728.9	758.7	8.0%
32	24	1235.4	1128.8	1296.3	1311.5	1227.9	1185.6	1295.2	1207.7	1273.6	1226.8	1148.6	1230.7	4.9%
33	25	1263.5	1157.8	1301.1	1223.8	1217.4	1210.5	1306.7	1176.2	1297.2	1218.4	1119.4	1226.5	5.0%
34	26	1219.3	1120.1	1291.5	1301.0	1162.0	1226.5	1197.7	1211.9	1278.9	1220.3	1051.6	1207.3	6.2%
36	28	2364.3	2274.7	2255.2	2270.3	2259.3	2258.3	2259.7	2259.5	2255.4	2260.4	2268.0	2271.4	1.4%
37	29	2428.6	2286.7	2412.0	2175.9	2355.0	2401.9	2182.4	2295.1	2394.8	2296.2	2357.0	2326.0	3.8%

CV平均　13.0%

表 17　実血清検体の基準キット測定平均値で補正したキット間の相関性

		Y軸										
		ID-LC/MS	キットA	キットB	キットC	キットD	キットE	キットF	キットG	キットH	キットI	キットJ
X軸	ID-LC/MS		0.949	0.967	0.933	0.956	0.955	0.925	0.923	0.969	0.946	0.950
			-17.38	59.80	42.10	25.36	41.30	64.78	72.37	51.72	39.39	-2.93
			0.999	0.998	0.996	0.999	0.999	0.996	0.998	0.998	0.999	0.998
	キットA	1.052		1.016	0.977	1.006	1.004	0.973	0.971	1.019	0.995	1.000
		19.17		78.95	67.26	43.68	59.69	83.05	89.61	71.13	57.87	14.79
		0.999		0.997	0.995	0.999	0.999	0.995	0.998	0.996	0.998	0.999
	キットB	1.031	0.978		0.972	0.987	0.985	0.957	0.953	1.003	0.978	0.979
		-59.37	-73.07		-27.33	-32.58	-16.27	8.05	16.22	-8.52	-18.38	-58.77
		0.998	0.997		0.996	0.999	0.999	0.997	0.998	1.000	0.999	0.996
	キットC	1.062	1.013	1.021		1.012	1.008	0.979	0.971	1.020	0.999	1.006
		-37.08	-60.43	34.68		-4.59	13.41	40.39	52.66	30.99	13.95	-36.88
		0.996	0.995	0.996		0.995	0.994	0.997	0.996	0.995	0.997	0.991
	キットD	1.044	0.991	1.011	0.979		0.998	0.968	0.965	1.014	0.990	0.993
		-25.13	-41.24	34.36	12.62		16.65	40.27	47.68	25.83	14.47	-27.55
		0.999	0.999	0.999	0.995		0.999	0.997	0.999	0.999	0.999	0.999
	キットE	1.046	0.993	1.013	0.980	1.001		0.968	0.967	1.015	0.991	0.994
		-42.16	-57.30	18.15	-3.16	-15.62		25.98	32.35	9.68	-1.22	-43.52
		0.999	0.999	0.999	0.994	0.999		0.995	0.998	0.999	0.999	0.999
	キットF	1.073	1.017	1.040	1.016	1.027	1.024		0.992	1.043	1.018	1.018
		-64.04	-77.57	-3.99	-36.64	-37.22	-19.60		11.42	-13.24	-23.68	-63.02
		0.996	0.995	0.997	0.997	0.997	0.995		0.996	0.998	0.998	0.994
	キットG	1.079	1.025	1.045	1.021	1.033	1.031	1.001		1.048	1.023	1.026
		-74.43	-88.56	-13.63	-46.70	-47.45	-30.96	-6.00		-22.46	-32.92	-74.60
		0.998	0.998	0.998	0.996	0.999	0.998	0.996		0.998	0.999	0.997
	キットH	1.027	0.974	0.997	0.971	0.984	0.982	0.954	0.950		0.975	0.975
		-49.75	-63.71	9.05	-22.48	-23.76	-7.36	16.03	24.59		-9.98	-49.96
		0.998	0.996	1.000	0.995	0.999	0.999	0.998	0.998		0.999	0.996
	キットI	1.054	1.000	1.021	0.994	1.009	1.007	0.979	0.975	1.025		1.001
		-39.57	-54.57	19.96	-8.10	-13.64	2.82	25.82	34.12	11.05		-40.64
		0.999	0.998	0.999	0.997	0.999	0.999	0.998	0.999	0.999		0.997
	キットJ	1.050	0.997	1.014	0.976	1.004	1.003	0.971	0.970	1.017	0.993	
		5.32	-12.82	65.46	51.21	29.72	45.87	70.37	76.43	57.09	44.30	
		0.998	0.999	0.996	0.991	0.999	0.999	0.994	0.997	0.996	0.997	

※傾きが0.8~1.2以外を網掛け

1段目：傾き
2段目：Y切片
3段目：相関係数

傾き最大 1.079　　**傾き最小** 0.923

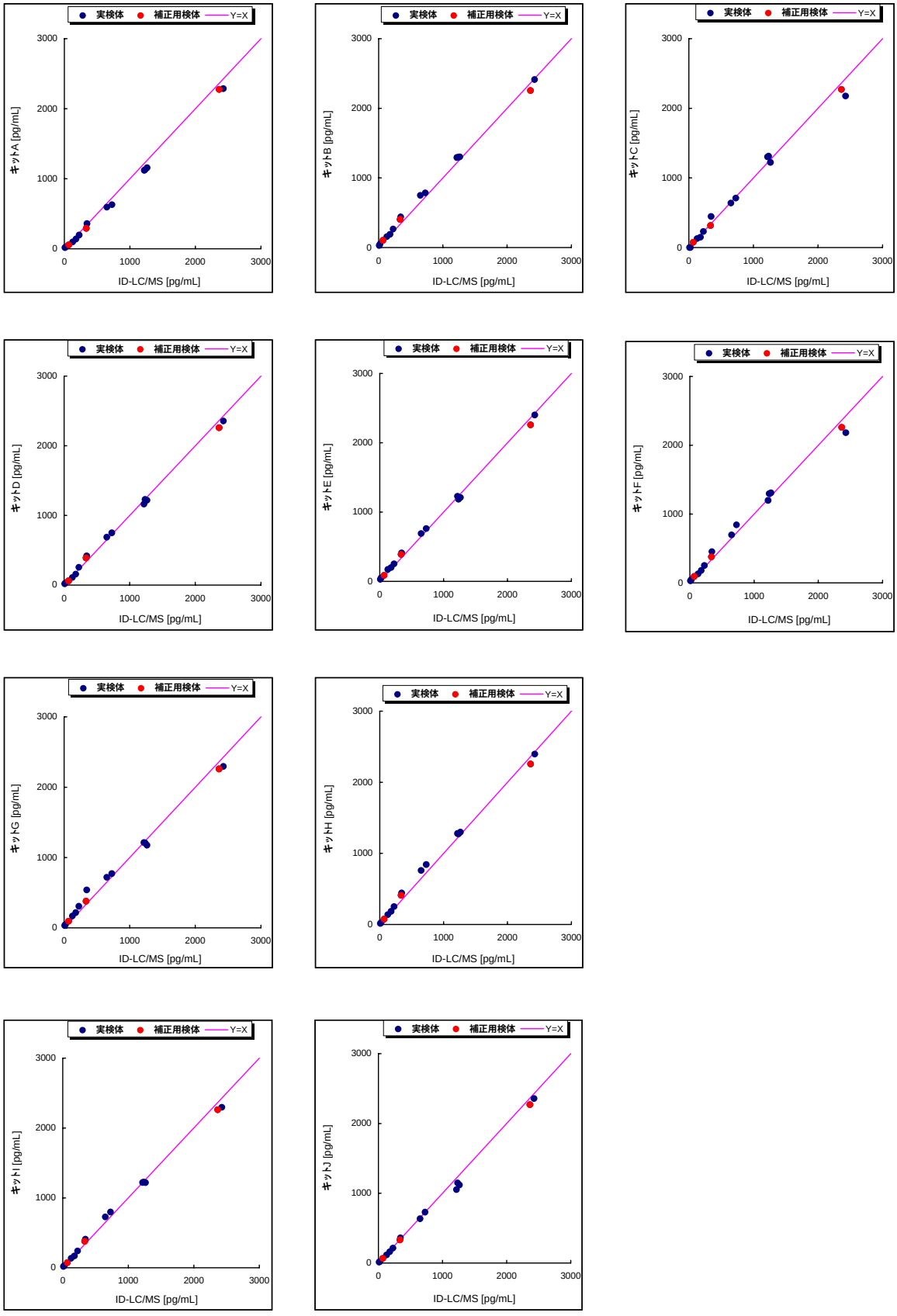


図７　実血清検体の基準キット測定平均値で補正したキット間の相関性

3）考察

エストラジオールにおける測定値の互換性に関するデータを評価したが、現状でもキット間で大きく乖離する検体は無く、相関係数としては良好なものであった。ただし今回の検討において使用した検体はプール血清であるため、検体の個体間差が平均化している可能性がある。

回帰式の傾きはキットにより差異が見られ、測定値の統一化が必要である。そこで、実試料系標準物質候補品や IRMM を各キット共通のキャリブレータとして使用した場合の検討を行ったが、やはり回帰式の傾きはキットにより差異が認められた。エストラジオールの測定系は競合反応を原理としているため、測定検体のマトリックスの影響などを受けやすい。今回検討に用いた実試料系標準物質候補品は凍結乾燥されたエストラジオールを人工的に添加したものであるため、何らかの影響によって回帰式の傾きに差異が生じたものと推測された。

そこで評価に用いた実血清検体の中から 3 検体を選択し、その ID-LC/MS 測定値を共通のキャリブレータとして各キットの測定値を補正したところ、回帰式の傾きは収束し、測定値の統一化の可能性が示された。ID-LC/MS は基準測定操作法の候補ではあるが、操作が煩雑であるため、ID-LC/MS 測定値を良く伝達しているキットを基準キットとして複数選択、それらの測定平均値で各キットの測定値を補正したところ、ID-LC/MS で補正した場合と同等の収束が認められた。以上ことから、市販のキットから選択した基準キットで値付けしたヒトプール血清（抗原未添加）を共通のキャリブレータとすることで測定値の統一化ができると考える。

4-2 標準化および標準物質の設定経過

実試料系標準物質候補品や IRMM を各キット共通のキャリブレータとして使用した場合ではキット間の相関回帰式の傾きは収束しなかったが、ヒトプール血清（抗原未添加）を共通のキャリブレータとすることで傾きは収束し、測定値の統一化ができると考える。

4-3 値付けの測定方法の選択

基準測定操作法の候補としては、ID-LC/MS が挙げられる。しかしながら、高精度な測定が可能な施設が限られていること、操作が煩雑であることなどから最上位の標準物質の値決めなどに限定される。

実用的で簡便な値決め方式としては、市販のキットの中から ID-LC/MS の測定値を良く伝達しているキットを選択し、それらキットによる共同実験によってヒトプール血清（抗原未添加）を値付けする方法も考えられる。内部および外部精度管理試料やサーベイ試料の値付けに有用であろう。

5．標準物質の設定概要

今後設定する。

6．標準物質の作製プロトコル

6-1 トレーサビリティ連鎖

トレーサビリティ連鎖として、以下の２つのモデルが考えられる。

（モデル1）

材料	校正 値付け	操作法	実施
		①基準測定操作法 ・ID-LC/MS,	ReCCS
②校正用標準物質 ・ヒトプール血清（抗原未添加）			
		③製造業者内測定操作法 ・各社キット	Manufacturer
④製造業者内の上位標準品			
		⑤製造業者内測定操作法 ・各社キット	Manufacturer
⑥各社キットのキャリブレータ			
		⑦日常検査法 ・各社キット	End-user
⑧日常試料（患者血清）			
	⑨測定値		

（モデル2）

材料	校正 値付け	操作法	実施
		①基準測定操作法 ・ID-LC/MS	ReCCS
②実試料系標準物質（抗原添加） ・ヒト血清ベースに E2 純物質（日本公定書協会標準品、USP、等）を添加したもの			
		③市販キットによる共同実験 ・ID-LC/MS の測定値を伝達可能なキットを用いる（複数）	？
④校正用標準物質 ・ヒトプール血清（抗原未添加）			
		⑤製造業者内測定操作法 ・各社キット	Manufacturer
⑥製造業者内の上位標準品			
		⑦製造業者内測定操作法 ・各社キット	Manufacturer
⑧各社キットのキャリブレータ			
		⑨日常検査法 ・各社キット	
⑩日常試料（患者血清）			End-user
	⑪測定値		

6－2試料の性状規格

今回の調査でヒトプール血清（抗原未添加）であれば測定値の統一化が可能であることが分かった。しかしながら詳細な性状や保存条件を決定するまでには至っていない。また、検体の個体間差や干渉物質が含まれる可能性もあるなど、ヒト血清の収集方法についても課題が残さ

れている。今後標準化を進める際に調査する必要がある。

6-3値付けの方法

トレーサビリティ連鎖（6-1）のモデルに示したように、ID-LC/MSで直接値付けしたヒトプール血清（抗原未添加）を校正用標準物質とする方法（モデル1）、もしくは、ID-LC/MS で値付けされた実試料系標準物質（抗原添加）を最上位の標準物質とし、ID-LC/MSの測定値を伝達可能な複数の市販キットによる共同実験でヒトプール血清（抗原未添加）を値付けしたものを校正用標準物質とする方法（モデル2）が考えられる。

7．今後の課題

今回の調査では、ID-LC/MS でヒトプール血清を直接値付けする方法、もしくは、市販のキットの中から ID-LC/MS の測定値を良く伝達しているキットを選択し、それらキットでヒトプール血清（抗原未添加）を値付けする方法によって測定値の統一化が可能であることが示された。しかしながら、キットの選択方法、共通の標準物質に用いるヒトプール血清の条件や性状、保存条件等については未決定であり、今後調査する必要がある。

8．結び

共通の標準物質を設定することで測定値の統一化の可能性が示された。しかしながらその実現には共通の標準物質に用いるヒトプール血清の条件やその値付けに用いるキットの選択など、詳細を決定していく必要がある。

今回の検討に使用しました試料の分析や提供および種々のご助言をいただきました慶應義塾大学　村田　満教授に深謝いたします。

2-4-2-6　フリー　T4

要旨

1）遊離型サイロキシン（FT4）についてキット間差の現状把握ならびに、共通の標準物質によるデータ統一化の可能性と解決すべき課題を明らかにすることを目的として調査研究を実施した。

2）昨年度のアンケート調査で、FT4 には公的標準品が無く、多くのキットが平衡透析法もしくは既存製品を基準として、各社独自の方法でキャリブレータの濃度が設定されていることが確認された。また、文献調査から、実検体によるキット間の傾向とコントロールサーベイによる傾向が異なることが確認され、キット間差の検討には、人工的に調製されたコントロールよりも、実検体での比較が必要と考えられた。

3）本年度は共同実験により校正用標準品による測定値の収束性について検討した。また、一部の検体については FT4 の基準測定操作法である平衡透析-液体クロマトグラフ同位体希釈質量分析法（ED-ID-LC/MS）による測定値との比較を実施した。

4）キット間差の現状としては、CV 平均で 22 %、全キットの平均値と比較した場合、相関の傾きで 0.76～1.31 の開きがあることが確認された。

5）校正用標準品の候補品（3 種）を用いて校正しても、キット間差は改善しなかった。

6）ヒトプール血清（抗原未添加）を校正用標準品とすることで、キット間差の改善が確認された。ただし、シングルドナー血清では、個体差の影響を受ける可能性が示唆され、一般の臨床検体のデータ統一には限界があると考えられた。

7）FT4 の基準測定操作法である ED-ID-LC/MS との比較では、各キットの測定値は約１／２の低値を示した。ただし、ED-ID-LC/MS の妥当性については国際的な検証試験が進められているため、現段階では参考値として扱う必要がある。また、ED-ID-LC/MS による検討結果を基に、ED-ID-LC/MS で値付けされた上位標準物質から適切に値を伝達できる市販キットの選択方法についても試行した。

8）以上の結果を基にトレーサビリティ連鎖のモデルを考案した。モデル１として、FT4 の基準測定操作法である ED-ID-LC/MS で直接値付けしたヒトプール血清（T4 未添加）を校正用標準物質とする方法、モデル２として、ED-ID-LC/MS で値付けされた実試料系標準物質（T4 添加）を最上位の標準物質とし、ED-ID-LC/MS の測定値を適切に伝達できる複数の市販キットによる共同実験によって、でヒトプール血清（T4 未添加）を値付けしたものを校正用標準物質とする方法を挙げた。

9）ヒトプール血清（T4 未添加）を校正用標準品とすることで、キット間差の改善が確認された。しかし、検体の個体間差や干渉物質が含まれる可能性もあるなど、ヒト血清の収集、選別方法については多くの困難な課題が残されている。

1．目的

本調査研究項目群 C6-WG の遊離型サイロキシン（FT4）について、キット間差の現状把握ならび

に、共通の標準物質によるデータ統一化の可能性について検証することを目的とした。

２．委員会の構成

本委員会は、調査研究項目群の柱１C5-WG で、メンバーの構成を下記に記す。なお WG 発足以降、メンバーの入れ替わりがあったため、下表は 19 年度報告書作成時のメンバーとした。

	氏名	所属
アドバイザー	家入　蒼生夫	獨協医科大学
アドバイザー	小田桐　恵美	東京女子医科大学
アドバイザー	桑　克彦	筑波大学
アドバイザー	森下　芳孝	名古屋大学
アドバイザー	谷　渉	検査医学標準物質機構（ReCCS） （旧名:HECTEF スタンダードレファレンスセンター）
運営管理者（臨薬協）	長谷川　典子	日本バイオラッド株式会社
責任者（兼　柱１担当）	塚本　久雄	東ソー株式会社
集計・解析担当者	髙　瑛姫	アボットジャパン株式会社
集計・解析担当者	富田　允	富士レビオ株式会社
技術担当者	阪崎　伸一郎	栄研化学株式会社
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社
技術担当者	保田　徹	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	御子柴　浩	オリンパス株式会社
技術担当者	菊地　強	株式会社コスミックコーポレーション
技術担当者	誉田　大仁	三洋化成工業株式会社
技術担当者	上野　哲男	シスメックス株式会社
技術担当者	斉藤　憲祐	デイド　ベーリング株式会社
技術担当者	坂本　純一	日本ビオメリュー株式会社
技術担当者	西村　和子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	齋藤　真人	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	作田　俊隆	ヤマサ醤油株式会社
技術担当者	岩朝　勝啓	ヤマサ醤油株式会社
技術担当者	下川　洋太郎	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	吉田　雅之	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	山本　幸子	和光純薬株式会社

３．委員会の開催

①　第一回会合：2005/11/8（火）13：00～17：30　　（臨薬協会議室）

② 第二回会合：2005/12/5（月）13：00～17：00　（臨薬協会議室）
③ 第三回会合：2006/1/23（月）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
④ 第四回会合：2006/8/21（月）15：00～17：00　（臨薬協会議室）
⑤ 第五回会合：2006/12/27（水）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑥ 第六回会合：2007/2/14（水）13：00～15：00　（臨薬協会議室）
⑥ 第七回会合：2007/5/23（水）15：00～17：00　（T-CAT 2F-A 室）
⑥ 第八回会合：2007/6/27（水）15：00～17：00　（臨薬協会議室）
⑥ 第九回会合：2008/2/21（木）15：00～17：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４-１測定値の互換性の現状

１）平成 18 年度調査結果

昨年度のアンケート調査で、FT4 には公的標準品が無く、各社独自の方法でキャリブレータの濃度が設定されていたが、平衡透析法、もしくは平衡透析法に準拠した既存製品を基準としている場合が多かった。また、文献調査から、実検体によるキット間の傾向とコントロールサーベイによる傾向が異なることが確認され、キット間差の検討には、人工的に調製されたコントロールよりも、実検体での比較が必要と考えられた。

２）現状把握のための共同実験（平成 19 年度）

①実行計画書（資料１）

実行計画書に従って、共同実験を実施した。

なお、検討に用いた実血清検体は、「ＪＣＣＬＳ標準化基本検討委員会　柱１：臨床検査用標準物質の研究開発」で測定するヒト検体についての見解（2006 年 1 月 10 日）」に従って配布した。

②共同実験への参加協力企業

以下の 10 社（10 キット）が共同実験（FT4 測定）に参加した。

企業名（順不同）
アボットジャパン株式会社
日本ビオメリュー株式会社
三洋化成工業株式会社
ベックマン・コールター株式会社
オリンパス株式会社
東ソー株式会社
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社
シスメックス株式会社
富士レビオ株式会社

③測定サンプル

以下の７種のサンプルを各キットで測定し、測定値比較および収束性を確認した。

	略称	校正用標準品	内容	備考
1	HECTEF-AS1	候補１	血清標準物質候補品 3 濃度（AS1-1～3） （候補１）ReCCS 作成	新鮮プール血清に T4 を添加 AS1-1 はベースのため未添加
2	HECTEF-C1	---	血清管理物質候補品 2 濃度（C1-1、2） ReCCS 作成	凍結乾燥コントロール
3	HECTEF-PS1	---	新鮮プール血清 1 例 ReCCS 作成	
4	A 社 CAL	候補２	A 社の製品キャリブレータ 2 濃度（液状品） （候補２）	血清ベースに T4 添加 その他の情報は非公表
5	B 社 CAL	候補３	B 社の製品キャリブレータ 6 濃度（凍結乾燥品） （候補３）	血清ベースに T4 添加、 その他の情報は非公表
6	Pool 検体	---	実検体（15 例） （プール血清）	国内の医療施設の協力で収集
7	Single 検体	---	実検体（5 例） （シングルドナー血清）	市販品（輸入）

④平衡透析-ID-LC/MS による測定（資料２）

実行計画書にある、WG 作成の評価用標準品（候補１）の作製は、検査医学標準物質機構（旧名：HECTEF スタンダードレファレンスセンター）（以下、ReCCS と記載）に委託した。また、その表示値も ReCCS にて「平衡透析-液体クロマトグラフ同位体希釈質量分析法」（以下、ED-ID-LC/MS と記載）で値付けされた。

なお、ReCCS では ED-ID-LC/MS 法の妥当性を検証する為に、ベルギーのゲント大学を中心とする IFCC グループと 2007 年末から共同実験を行っており、その結果は 2008 年の AACC で報告される予定となっている。従って、今回の ED-ID-LC/MS 法による測定値については、現時点では評価はできない状況にあるため、本報告書では参考値として取り扱うものとした。

３）共同実験結果

①キット間差の現状

（1）全データ、キット間 CV （資料３）

サンプルの種類や濃度域によっても異なるが、標準品の候補品では CV 値が 12～35 %、実検体では、CV 値が 13～39 %とキット間での測定値のばらつきが確認され、CV 平均は 22 %であった。

（2）全キットの平均値との比（資料４）

サンプルの種類や濃度域によっても異なるが、最も差が少ないサンプルでも平均値との比が 82～115%（最大 33%）の開きが、差の最も大きいサンプルでは平均値との比が 56～174%（最大 118%）の開きがみられた。

（3）全社平均に対する各キットの相関性（資料５）

回帰式の傾きは、0.76～1.31 となり、キット間差は最大で 55%であった。

（4）サンプルの種類別の相関性（資料６、７）

全社平均に対する各キットの相関性について検討するため、サンプル別に相関図を作成した。サンプルの種類によってキット間に差がみられた。Pool 検体を基準とした場合、特に T4 を添加した人工的なサンプルでは差が大きくなる傾向がみられた。

T4 を添加していない Pool 検体と Single 検体間でも差がみられる場合もあり、Pool 検体では個体差が平均化されているのに対して、Single 検体では個体差の影響が考えられた。

②標準品候補による校正

（1）候補１：HECTEF-AS1　（資料８）

校正によって、実検体では CV 平均は校正前の 22%から 25%に上昇し、キット間の収束性は改善しなかった。回帰式の傾きは、0.79～1.40 となり、キット間差は最大で 61%となった。

（2）候補２：A 社の製品キャリブレータ（資料９）

校正によって、実検体では CV 平均は校正前の 22%と変わらずキット間の収束性は改善しなかった。回帰式の傾きは、0.83～1.45 となり、キット間差は最大で 62%となった。

（3）候補３：B 社の製品キャリブレータ（資料 10）

校正によって、実検体では CV 平均は校正前の 22%から 24%に上昇し、キット間の収束性は改善しなかった。回帰式の傾きは、0.71～1.49 となり、キット間差は最大で 78%となった。

③プール血清による校正

（1）全濃度域のデータから補正係数を算出した場合（資料 11）

校正によって実検体の CV 平均は校正前の 22%から 13%に低下し、キット間の収束性が向上した。特に高濃度域で効果が顕著であった。回帰式の傾きは、0.997～1.005 となり、キット間差は見かけ上、１%未満となった。ただし、低濃度～正常濃度での収束性は不十分であり、また、各検体の個体差の影響も無視できない。

（2）正常域のデータから補正係数を算出した場合（資料 12）

校正によって実検体の CV 平均は校正前の 22%から 11%に低下し、これまでの検討の中では最も CV 値が改善した。特に正常濃度域での効果が高かった。ただし、シングルドナー血清（1.0～1.8ng/dL）の CV 値は 12～17%にと留まっており、同等濃度のプール血清の CV 値（2～8%）に比べて、効果が少なかった。プール血清では個体差が平均化されているのに対して、シングルドナー血清では、個体差の影響を受けている可能性が考えられる。

回帰式の傾きは、0.87～1.09 となり、キット間差は最大 22%となった。正常濃度域の収束性を重視した補正方法にしたために、校正の効果に偏りが生じ、高濃度域の差が広がったものと考えられ、全濃度域を一定の係数で補正することの限界が示唆された。

④ED-ID-LC/MS と各キットの相関性

（1）測定サンプルの限定

ED-ID-LC/MS による測定操作の煩雑性、測定コストの制限、等の理由によって、以下の 3 種の限られたサンプルでのみ実施した。

・HECTEF-AS1（標準品候補１）
・HECTEF-PS1（新鮮プール血清）
・Single 検体（シングルドナー血清）

※プール血清の測定も計画していたが、検体量の不足により実施できなかった。

（2）相関性（全サンプル）（資料 13）

回帰式の傾きは 0.434～0.638 となり、ED-ID-LC/MS による測定値に対して、各キットの測定値は低値となった。

ED-ID-LC/MS の妥当性については、ReCCS および IFCC グループで検証実験が進められている段階であり、現時点では評価はできない状況にあるため、現時点では参考値として取り扱う必要がある。

（3）相関性（サンプル種別）（資料 14）

ED-ID-LC/MS との比較した場合、プール血清、シングルドナー血清、T4 添加血清などの、サンプルの種類による差が比較的大きいキットと小さいキットがみられた。

4）考察

キット間差の現状としては、CV 平均で 22%、相関の傾きで、0.76～1.31 の開きがあることが確認された。また、標準品の候補品（3 種）を用いて校正しても、CV 平均は 22～25%となりキット間差は改善しなかった。標準品の候補品でデータが収束しない理由として、T4 を添加するなど人工的に調製されたサンプルと実検体とでは、キット間のデータ傾向が異なる

ためと推察された。

そこで、プール血清を基準として校正したところ CV 平均が 11～13%となり、キット間差の改善が確認された。以上の結果から、校正用標準品としては、プール血清が最も適切と考えられた。なお、今回の校正シミュレーションでは、一定の補正係数によって校正したが、このような一律補正では校正の効果に偏りが生じることが確認された。このため、実際に校正用標準品を作製する場合は、低濃度域から高濃度域までを偏りなく校正できるよう、多点の校正用標準品を作製することが必要と考えられた。

ところで、プール血清による校正効果が期待される一方で、シングルドナー血清では、プール血清ほどの収束がみられないという結果が得られた。プール血清では個体差が平均化されているのに対して、シングルドナー血清では、個体差の影響を受けている可能性がある。従って、検体の個体差を考えると、一般の臨床検体のデータ統一には限界があると考えられた。ただし、今回用いたシングルドナー血清は市販品（輸入品）であり、一般の臨床検体の傾向を反映しているかどうかなどの検証はされていないことに留意しておく必要がある。

平衡透析-ID-LC/MS 法との比較では、回帰式の傾きは 0.434～0.638 となり、ED-ID-LC/MS による測定値に対して、各キットの測定値は全て低値を示し、約１／２の値となった。しかし、昨年の各社へのアンケート調査では、各キットのキャリブレータは、各社独自の値付けではあるものの、古典的な平衡透析法で値付けされているか、または古典的な平衡透析法に準拠した既存のキットで値付けされている場合が多かった。同じ平衡透析法であるにも関わらず、このような差が生じた理由として以下のことが推察された。

即ち、「古典的な平衡透析法」と今回の「平衡透析-ID-LC/MS 法」では、平衡透析の手法は同じであるが、透析後の T4 測定の方法が異なっている。古典的な方法では、高感度 RIA が用いられていたのに対して、今回の測定で用いた ID-LC/MS は、より高感度、高精度に測定できる分析法であり、透析後の T4 が容器等に吸着して減衰してもこれを補正できるといった特長を有している。このような、透析液中の T4 測定方法の相違が測定値差の一因と考えられた。

なお、ED-ID-LC/MS は信頼性の高い分析法として注目されているが、FT4 測定の妥当性については、現在 ReCCS および IFCC グループで検証実験が進められている段階であるため、現時点では参考値として取り扱う必要がある。

将来、ED-ID-LC/MS の妥当性が実証されたとしても、国際的な認証を受けられるような高精度の測定施設は限られるため、最上位の標準物質の値付けなどに限定される可能性がある。そこで実用的で簡便な値付け方式として、ED-ID-LC/MS で値付けされた上位標準物質から適切に値を伝達できる市販キットを選択し、それらキットによる共同実験によってプール血清等の実試料標準品に値付けする方法が考えられる。そのような場合を想定して、ED-ID-LC/MS の値を伝達できるキットの選択を試みた。その方法として、①ED-ID-LC/MS との相関係数を選択基準とする方法と、②回帰式の傾きを選択基準とする方法で試行したところ、①および②の両方の基準に該当するキットとして、３種のキットが選択された。

ただし、この結果は今回の限られたサンプルを用いた場合の結果であって、更にサンプル数を増やすなどの検討を重ねた上で最終的な判断をする必要がある。

4－2標準化および標準物質の設定経過

ヒト血清ベースにT4を添加して人工的に作製された校正用標準品（候補１～３）による校正では、キット間の相関回帰式の傾きは収束しなかったが、T4未添加のヒトプール血清に値付けしたものを校正用標準品とすることで、ある程度までは測定値の統一化ができると考えられる。

4－3値付けの測定方法の選択

１）基準測定操作法の候補

FT4 の基準測定操作法の候補としては、「平衡透析-液体クロマトグラフ同位体希釈質量分析法」（以下、ED-ID-LC/MS）が挙げられるが、その妥当性について、ReCCS および IFCC グループで検証実験が進められている段階である。

２）ED-ID-LC/MS の値を伝達できるキット選択の試み

今後、ED-ID-LC/MS の妥当性が実証されたとしても測定操作が煩雑であり、高精度な測定が可能な施設は国際的にも限られると予想される。このため、ED-ID-LC/MS は最上位の標準物質の値付けなどに限定される可能性がある。

そこで実用的で簡便な値付け方式として、ED-ID-LC/MS で値付けされた最上位の標準物質から適切に値を伝達できる市販キットを選択し、それらキットによる共同実験によってプール血清等の実試料標準品に値付けする方法が考えられる。そのような場合を想定して、今回の共同実験のデータを基に、ED-ID-LC/MS の値を伝達できるキットの選択を試みた。

なお、ED-ID-LC/MS の測定値を伝達できるキットとは、人工的なサンプル（T4 添加血清）や、実検体（プール血清、シングルドナー血清）などの、サンプル種に関係なく ED-ID-LC/MS と相関性が良好なキットが該当すると考えられる。

以上のような考え方に基づいて、以下の２通りの方法でキットの選択を試みた。

①ED-ID-LC/MS との相関係数を選択基準とする方法

全サンプルでの検討における相関係数（ｒ）が 0.990 以上のキットを選択した場合、４キットが該当した（資料 13）

キット No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ｒ≧0.990	-	-	○	○	-	○	-	○	-	-

②サンプル種別の回帰式の傾きのバラツキを選択基準とする方法

サンプル種別の傾きのＣＶ値が 10%以下のキットを選択した場合、以下の５キットが該当した。（資料 14）

キット No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV≦10%	-	-	○	○	○	○	○	-	-	-

③上記①および②の両方の基準に該当するキットとして、３種のキットが選択された。

キット No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
両条件	-	-	○	○	-	○	-	-	-	-

ただし、以上の結果は今回の限られたサンプルを用いた場合の１回の試行によるものであって、更にサンプル数を増やし、測定回数重ねて再現性の検証をするなどの検討を重ねた上で慎重に判断する必要がある。

５．標準物質の設定概要

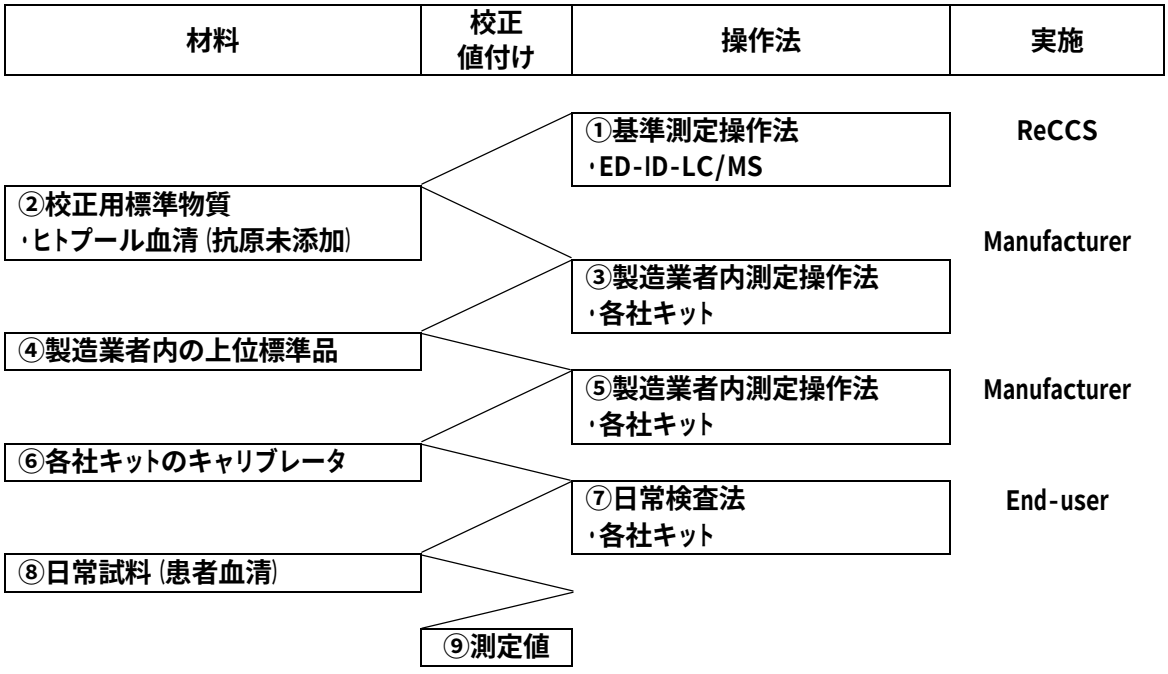
今後の検討が必要である。

６．標準物質の作製プロトコル

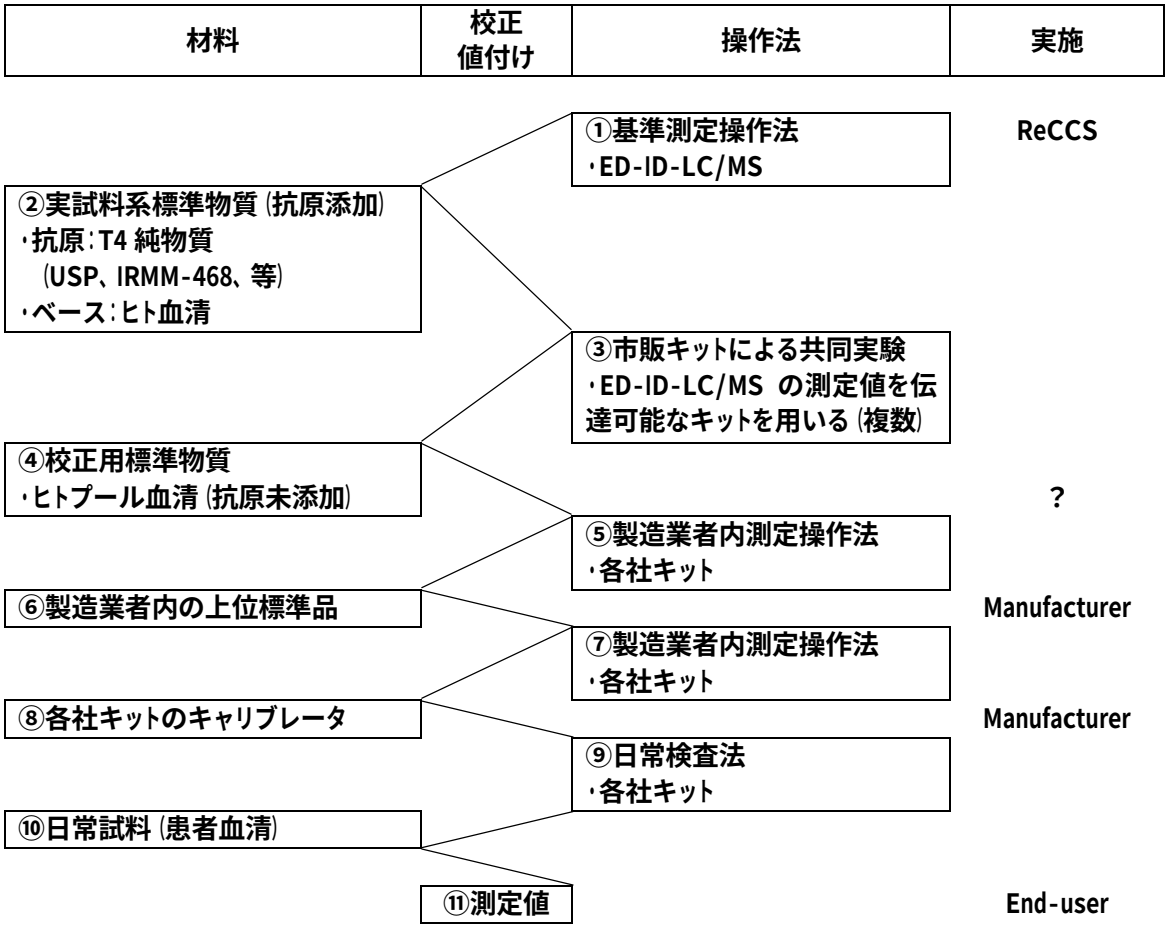
６-１トレーサビリティ連鎖

トレーサビリティ連鎖として、以下の２つのモデルが考えられる。

(モデル1)



（モデル2）



6－2 試料の性状規格

今回の調査でヒトプール血清（抗原未添加）を校正用標準品とすることで、キット間の測定値の収束性が改善することが確認された。しかし、検体の個体間差や干渉物質が含まれる可能性もあるなど、ヒト血清の収集、選別方法については課題が残されている。

6－3 値付けの方法

トレーサビリティ連鎖のモデル１に示したように、FT4 の基準測定操作法である平衡透析-液体クロマトグラフ同位体希釈質量分析法（ED-ID-LC/MS）で直接値付けしたヒトプール血清（T4 未添加）を校正用標準物質とする方法が考えられる。

また、モデル２に示したように、ED-ID-LC/MS で値付けされた実試料系標準物質（T4 添加）を最上位の標準物質とし、ED-ID-LC/MS の測定値を適切に伝達できる複数の市販キットによる共同実験によって、でヒトプール血清（T4 未添加）を値付けしたものを校正用標準物質とする方法も考えられる。この方法は内部および外部精度管理試料やサーベイ試料の値付けにも有用と考えられる。ただし、市販キットの選択方法については、今回の試みの結果だけでは不十分であり、更に検討を重ねて慎重に判断する必要がある。

７．今後の課題

１）プール血清の収集、選別方法

抗 T4 自己抗体、異好抗体、薬剤、など非特異的な反応の原因となる物質を含まない血清を用いる必要がある。そのような血清をどのようにして収集、選別するかが課題と考えられる。

２）検体の個体差の問題

プール血清とシングルドナー血清では、キット間の測定値に異なる傾向がみられたことについて、プール血清では個体差が平均化されているのに対して、シングルドナー血清では、個体差の影響を受ける可能性が考えられた。トレーサビリティ連鎖のモデルに示した方法によって、キット間のデータの統一化がある程度までは実現できると考えられるが、個々の臨床検体のデータの統一化には限界があると予想される。

３）標準化（値付け変更）に伴う混乱の回避

今回の検討では、ED-ID-LC/MS に対して、市販キットの測定値は約１／２の低値となった。今後、ED-ID-LC/MS の妥当性が検証され、上記の差が確実になった場合、標準化によって FT4 値が現行の約２倍の値に切り替わることになり、臨床現場に混乱が生じる心配がある。そのような混乱が生じないよう、また、各キットの値付けの変更が円滑に進められるよう、行政、医療機関、ならびに関係企業の協力体制の構築が必要である。

８．結び

共通の標準物質を設定することで測定値の統一化の可能性が示された。しかしながらその実現には共通の標準物質に用いるヒトプール血清の条件やその値付けに用いるキットの選択など、解決すべき課題が多く残されている。

国際的な標準化の動向としては、IFCC において FT4 の検討が進められており平成 20 年には日本の企業も含めた、国際的な共同実験が計画されている。また、これに連動して日本甲状腺学会においてもインビトロ検査標準化委員会の設置が進められている。今回の調査研究の結果が、今後の FT4 標準化活動の参考になるものと期待される。

今回の検討に使用しました試料の分析や提供および種々のご助言をいただきました伊藤病院診療技術部　宮崎直子様、吉村弘様に深謝いたします。

資料１-1

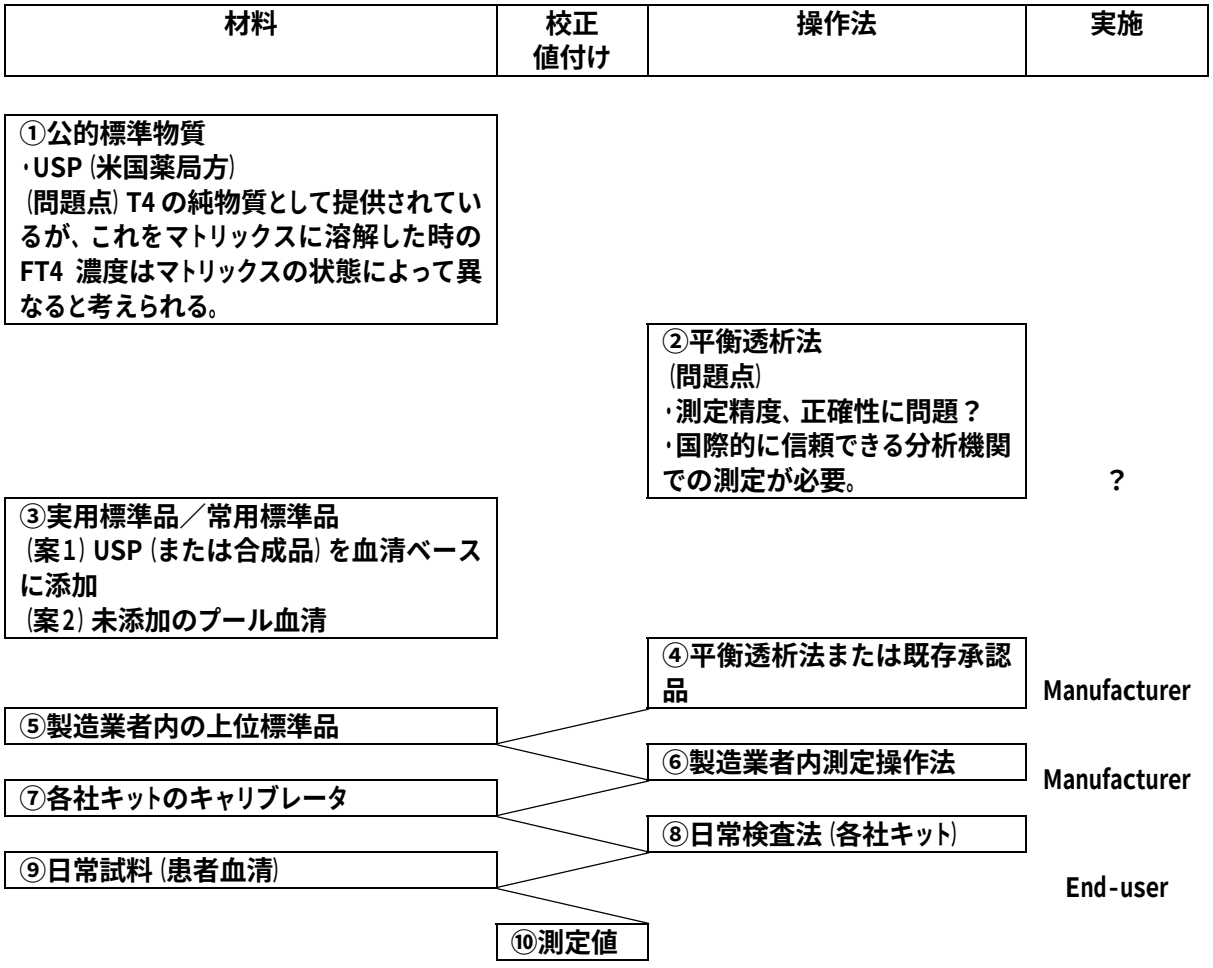
JCCLS 標準化基本検討委員会　柱１WG　C6
FT4 実行計画書

（2007 年 7 月 18 日報告分より抜粋）

1．FT4 のトレーサビリティ連鎖の現状と問題点

トレーサビリティシ連鎖の例を以下に示した。現状は④～⑩の状態であり、更に上位（①～④）へのトレーサビリティをどのように実現するかが課題と考えられる。

なお、厚生労働省の告示には、FT4 の公的標準物質として、米国薬局方（USP）が記載されているが、FT4 は平衡状態を測定する項目であるため、純物質である USP をどのようなマトリックスに溶解するかで、FT4 濃度は異なると考えられる。また、各メーカーでは、USP または合成品を各社独自のベースに添加したものを平衡透析法や既存承認品等の方法が用いて値付けしている。このような値付け方法の違いがキット差の一因と考えられる。



資料１-2

2. 検討の進め方

標準化基本検討委員会　柱１で最初に作成された実行計画書案には、公的標準物質や純物質などの抗原を各社のキャリブレータのベースに添加して校正用標準品を作成する方法、即ち抗原のみ共通化する方法が提案されていたが、特に外資系メーカーではこのような検討が困難であるため、添加抗原とベースを共通化した評価用標準品を作成するか、既存製品のキャリブレータを用いて、各社キットで比較検討することとした。作業手順の概要を以下に示した。

①評価用標準品の作製	添加抗原（T4）およびベース（血清または緩衝液）について適切なものを選定し、評価用標準品を調製する。 なお、既存製品のキャリブレータの中で検討可能なものがあればそれを用いる。
②実検体の収集	相関性の検討用として JCCLS に収集を委託する。
③各キットによる測定	評価用標準品と実検体を協力メーカーに配布し、各キットで測定する。
④平衡透析法による測定	一般的に平衡透析法が基準測定法とされている。可能であれば平衡透析法とも比較する。
⑤データ解析	（1）キット差の現状を確認する。 （2）各キットの測定値を収束させるための校正用標準品の作製について考察する。

3. 評価用標準品の作製

(ア)調製方法

評価用標準品の候補を下表に示した。FT4 の公的標準物質としては、米国薬局方（USP）が厚生労働省の告示に記載されているが、これは純物質（T4）であるため、市販の合成 T4 を添加抗原としても差し支えないと考えられる。しかし、WG で調製する候補１については、公的に認められたもので検討することが適切との判断から、抗原としては USP を選定した。また、ベースについては、FT4 は平衡状態を測定する項目であることから、できるだけ実検体に近い性状であることが望ましいと考えられ、ベースとしてはヒト血清を選定した。

また、メーカーから提供可能な既存製品を候補２，３として選定した。

資料１-3

	候補１	候補２	候補３
	WG 作製品 （ヘクテフ SRC に委託）	A 社製品	B 社製品
抗原	USP Levothyroxine （品番：1365000）	ヒト血清+T4 （詳細は未公表）	ヒト血清+T4 （詳細は未公表）
ベース	ヒト血清 （脱抗原しないで、内因性の T4 存在下で使用する。）		
添加剤	なし	保存剤	アジ化ナトリウム
備考	・ヒト血清は脱抗原しないで、内因性の T4 存在下で、USP の T4 を追加する。 ・目標濃度の 10 倍量を添加を目安とする。 ・混合後、冷蔵で長時間（一昼夜以上）静置。 （凍結保存）	液状 （冷蔵保存）	凍結乾燥品 （冷蔵保存）

(イ)評価用標準品の種類と作製数量

評価用標準品	抗原		濃度ポイント(ng/dl)	必要数量
候補１	WG 作製品	5 点	0.5, 1, 2, 4, 8	各 1ml x 13 本
候補２	A 社製品	2 点	1 ,4	各？ml x 11 本
候補３	B 社製品	6 点	0, 0.4, 1, 2, 4, 8	各 1ml x 11 本

※濃度ポイント：WG 作製品については目標値とした。また、既存製品の場合は表示値を参考とした。FT4 濃度は平衡状態にあるため、上記の濃度は参考値であり、絶対的な濃度ではないことに留意しておく必要がある。

※作製数量の根拠：11 メーカー（各社１キット）分として算出。WG 作製品の場合は、予備も含めて、1.2 倍の係数を掛けて各 13 本とした。

※平衡透析法での必要量：候補１は平衡透析法でも測定するため、更に 4ml 以上余分に作成しておく。

(ウ)標準品作製後の保存条件

1. 候補１（WG 調製）
   標準品は作製後、１ｍｌに分注して-７０℃以下で凍結保存する。
   配送する場合は、保冷剤としてドライアイスを使用する。
2. 候補２（A 社製品）（液状品）：メーカーの取り扱い条件に従うものとする。
3. 候補３（B 社製品）（凍結乾燥品）：冷蔵保存（2～8℃）

資料１-4

4. 実検体の収集

評価用標準品の評価には、実検体を一緒に測定して、比較検討することが不可欠であり、以下の実検体の収集を JCCLS に委託する。

なお、本検討に用いるヒト検体は、「ＪＣＣＬＳ標準化基本検討委員会　柱１：臨床検査用標準物質の研究開発」で測定するヒト検体についての見解（2006 年 1 月 10 日)」に従って配布されたものを用いるものとする。

(ア)プール血清

FT4(ng/dl)	検体数（本）	検体量	備考
0～0.8	2	各 20mL	・検体は血清であること。 ・量が多いためプールすることもやむを得ない。 ･TSH,FT3,FT4 のバランスが通常と明らかに異なるものは、干渉物質の存在する可能性があるため、除外する。 ・薬剤（抗甲状腺剤、甲状腺ホルモン製剤）の投与が明らかな検体は、それぞれの薬剤別にプールする。(完全な区別は困難であり、可能な限りとする。)
1～1.5	4		
1.5～2	4		
2～5	4		
5 以上	2		
全 16 例			

※1m l 小分け凍結で各 20 本。

※数量の根拠：11 メーカー（各社 1 キット）分として、各検体 11 本（11m l ）必要となる。また、平衡透析法による測定用として、4ml 必要であることから、最低でも 15m l は必要となる。予備も含めて、各 20 本（20ml）とする。

(イ)シングルドナー血清

FT4 は平衡状態にあるため、プール血清ではマトリックスが変化する可能性がある。シングルドナーの検体も入手し、それを検討に加えることが望ましい。

市販のシングルドナー血清の中から、FT4 測定によるスクリーニングを実施し、適当な濃度分布の検体を 5 例選択する。

必要量は、上記と同様の計算で 20ml とする。

5. 各キットによる測定

(ア)測定サンプル

評価用標準品と実検体を各メーカーに配布し、各キットのキャリブレータを基準として測定する。

種類		本数
標準品	候補１	5
	候補２	2
	候補３	6
実検体	プール血清	16

	シングルドナー血清	5

資料１-5

(イ)測定方法

① 評価用標準品（候補１）と実検体

・測定まで-７０℃以下で保存する。（-７０℃以下の冷凍庫が無い場合は、できるだけ低い温度で冷凍保存し、早めに測定する。）

・測定直前に室温で融解し十分に転倒混和する。

② 評価用標準品（候補２）

・測定まで冷蔵で保存する。

・測定前に室温に戻してから測定する。

③ 評価用標準品（候補３）

・測定まで冷蔵で保存する。

・測定前に 1m l の精製水を正確に加えて、室温に 20 分以上静置した後に 5 回転倒混和する。更に 10 分以上静置し、２～３回転倒混和してから測定する。

④ その他の留意点

・各キットの添付文書等に従って測定する。

・測定濃度以外にオリジナルの信号値も得られるようにしておく。

・測定検体がオーバーレンジとなっても、希釈測定は実施しない。（平衡状態のため）

・測定回数、試薬ロット数は各メーカーで判断する。

(ウ)結果報告

・別紙の結果報告書（エクセルファイル）に測定結果を入力し、データ集計担当者に送付する。

・報告する測定結果は、各メーカーによって平均値、中央値等を判断して代表値を報告する。

6. 平衡透析法による測定

FT4 の測定では、一般的に平衡透析法が基準測定法とされている。平衡透析法による測定が実施可能な施設（ヘクテフ SRC）で、上記の検体の一部を平衡透析法にて測定し、その結果を比較検討に用いる。なお、全ての検体を測定することはできないため、どの検体を測定するかは、各キットによる測定結果の解析を基に、代表検体を選択する。

種類		本数
標準品	候補１	5

実検体 （代表例）	プール血清	3
	シングルドナー血清	3

資料１-6

7. データ解析

報告された結果を基に、以下の点に留意して解析する。ただし、これは暫定的なもので、結果集計の状況をみながら、WG 内で協議して解析を進めるものとする。

(ア)現状のキット差の確認

・各キットのキャリブレータを基準として、実検体を測定した場合の比較（２キット間の相関性評価、各検体の収束性評価、等）によって、キット差の現状を明らかにする。

(イ)平衡透析法による測定値との比較

(ウ)マトリックスの影響についての評価

・評価用標準品、シングルドナー血清、プール血清の比較検討

(エ)校正用標準品候補による校正効果の評価材料としての評価

・評価用標準品による校正効果の確認

・プール血清の中から代表例を選択して、これによる校正効果の確認

8. まとめ

以上の結果から、現状のキット間の差を明らかにし、標準化を実現するための方法を考察する。また、標準化が困難である場合にはその原因を考察し、解決すべき課題を明らかにする。

以上

資料２-1

血清フリーサイロキシン（FT4）測定用標準物質候補品の作製（最終）

平成 20 年 2 月 18 日

有限責任中間法人 検査医学標準物質機構

〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 KSP R&D A205
TEL:044-813-0055　FAX: 044-813-0224

１．目的

血清中のフリーサイロキシン（FT4）測定用の常用標準物質候補品を作成し、基準測定操作法である平衡透析-液体クロマトグラフ同位体希釈質量分析法（ED-ID-LC/MS）[1)2)]で定量する。

1) Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Measurement of Free Thyroid Hormones; Approved Guideline. CLSI document C45-A

2) Katleen Van Uytfanghe, Dietmar Stöckl, H Alec Ross, and Linda M. Thienpont
"Use of Frozen Sera for FT4 Standardization: Investigation by Equilibrium Dialysis Combined with Isotope Dilution-Mass Spectrometry and Immunoassay"
Clin. Chem., Sep 2006; 52: 1817 - 1821.

２．調製試料

（１）標準物質候補品

CLSI 処方（脂質測定用の標準物質作成のための規定）に準じて用意した新鮮プール血清に T4 高純度認証標準物質（IRMM-468, 98.6±0.7%）を添加して 3 濃度を調製（0.2μmろ過処理）。プラスチックバイアルに 0.5mL ずつ分注して液体窒素で急速凍結したものを- 80℃保管。

AS1-1：無添加 FT4 濃度 約 1.5 ng/dL
AS1-2：添加後 FT4 濃度 約 4.5 ng/dL
AS1-3：添加後 FT4 濃度 約 7.5 ng/dL

（２）実検体

PS1：採血して冷蔵保存で１週間以内に凍結した血清（n = 20）を混和して 0.2μmろ過処理後、標準物質候補品と同様に分注、急速凍結したものを- 80℃保管。

SD1,SD2,SD3：シングルドナーの血清（3 種）を- 80℃保管。

３．測定方法の概要

図１に示すように、血清試料を平衡透析容器内でタンパク結合 T4 と FT4 を 37℃で 4 時間静かに回転混和して完全に平衡状態にする。FT4 のみを含む透析液に、T4 の安定同位体 $^{13}C_6$-T4 を内部標準として、$^{13}C_9$-T4 をキャリアーとして添加し、固相抽出により精製後、逆相高速液体クロマトグラフ質量分析を行った。エレクトロスプレーイオン化法により T4 および $^{13}C_6$-T4 をイオン化し、下記に示すそれぞれの特異的な生成イオンのピーク面積を測定した。T4 標準液（IRMM-468 をメタノールに溶解）に $^{13}C_6$-T4 と $^{13}C_9$-T4 を添加した後、同様にピーク面積を測定し、T4 と $^{13}C_6$-T4 のモル比(x) と面積比(y)の検量線から各試料の T4 濃度を求めた。

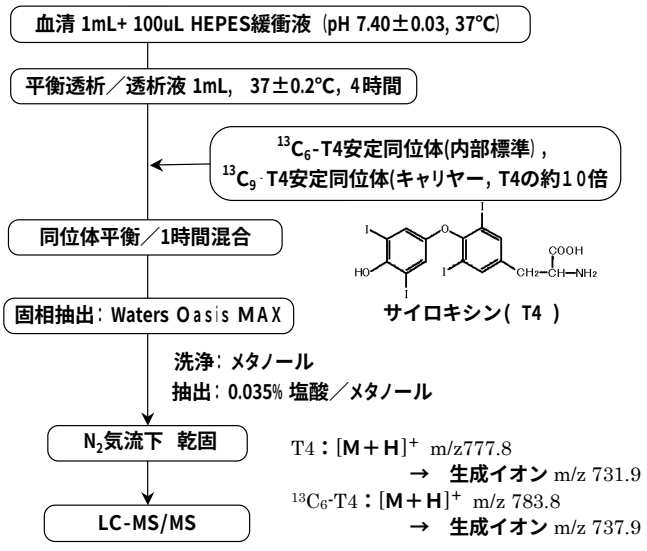


図１　ED-ID-LC /MS による血清 FT4 の測定操作

資料２-2

４．結果

血清 FT4 測定の平衡透析条件を規定するガイドラインが CLSI により作成されたのを受け、FT4 の ED-ID-LC/MS での超高感度測定を行った。

本法の検量線の直線性は､図２に示すように T4 と $^{13}C_6$-T4 のモル比 0.5 から 2.0 の範囲で良好であったので、各血清試料の T4 と $^{13}C_6$-T4 のモル比もその範囲内になるように調製した。本法による各血清試料の FT4 測定結果を表１（#1, #2 は日を変えた透析操作を表す）に示した。標準物質候補品の測定精度は CV で約 2%であり、本法が複雑な前処理を要する微量分析法であるにも関らず極めて良好な成績が得られた。さらに測定回数を増すことにより信頼性の高い認証値を定める基準測定操作法として、本法が適用できると思われる。

血清試料の免疫法の測定値（９試薬の平均値）と本法との関係は表 1、図３のように、標準物質候補品と実検体いずれについても免疫法が 40～50%低くなっている。しかし本法の測定値とほぼ直線関係がみられるので、標準物質候補品で校正すれば測定値の一致性が向上することが示唆されている。

表１　ED-ID-LC/MSによる各血清試料のFT4測定結果　　(ng/dl)

		ED-ID-LC/MS				免疫法測定値 (9試薬平均値)
		# 1	# 2	Mean	CV(%)	
AS1-1	Run 1	1.70	1.68	1.66	2.3	1.05
	Run 2	1.60	1.66			
AS1-2	Run 1	4.44	4.48	4.52	1.3	2.74
	Run 2	4.54	4.60			
AS1-3	Run 1	7.51	7.83	7.62	2.0	4.28
	Run 2	7.45	7.71			
PS1	Run 1	9.12	8.53	8.49	4.7	4.36
	Run 2	8.07	8.26			
SD1	Run 1	1.85	1.95	1.93	2.5	1.21
	Run 2	1.98	1.93			
SD2	Run 1	1.39	1.52	1.47	6.4	1.01
	Run 2	1.37	1.60			
SD3	Run 1	3.41	3.45	3.55	4.4	1.71
	Run 2	3.53	3.81			

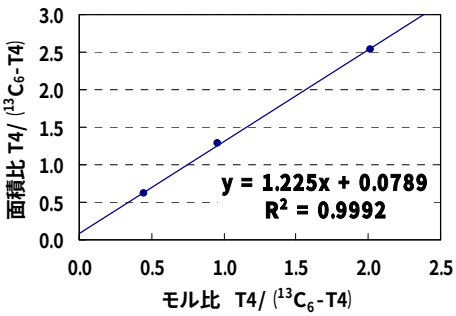


図２　検量線の例

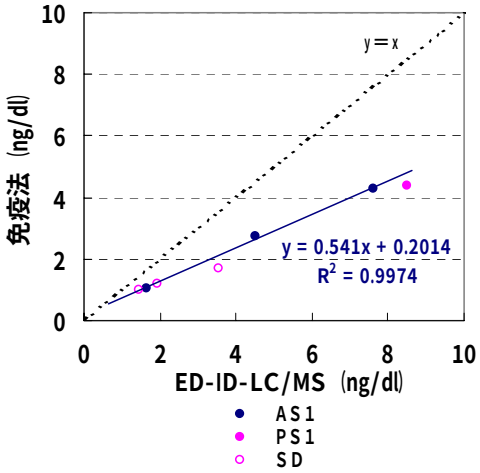


図３　ED-ID-LC/MS と免疫法（９試薬の平均）の FT4 測定値の直線性と一致性

以上

(注) 本資料中に、ED-ID-LC/MS 法と免疫測定法との比較が記されているが、この段階では、キット 10 のデータが揃っていなかったため、キット 1～9 の平均が用いられている。

資料３

【1】-1：キット間差の現状-----全データ、キット間CV

キット差の現状把握のため、各キットを用いて以下のサンプルを測定した。

1．標準品の候補品
- ・候補（1）　①HECTEF-AS1（血清標準物質候補品：新鮮プール血清にT4を添加、AS1-1はベースのため未添加）
  ②HECTEF-C1（血清管理物質候補品：凍結乾燥コントロール）
  ③HECTEF-PS1（新鮮プール血清）
- ・候補（2）　④A社CAL（A社の製品キャリブレータ：血清ベースにT4添加、液状品、その他の情報は非公表）
- ・候補（3）　⑤B社CAL（B社の製品キャリブレータ：血清ベースにT4添加、凍結乾燥品、その他の情報は非公表）

2．実検体　⑥Pool検体（プール血清）
⑦Single検体（シングルドナー血清）

各キットによる測定結果の一覧および全キットの平均値、標準偏差（SD）、変動係数（CV）を表に示した。
なお、平均値、SD、CVの算出には、キット1～10のデータを用いた。（ED-ID-LC/MSを除く）

サンプルの種類や濃度域によっても異なるが、標準品の候補品ではCV値が12～35%
実検体では、CV値が13～39%とキット間での測定値のばらつきが確認され、CV平均は22%であった。

1．標準品の候補品

標準品候補	連番	ID	理論濃度	ED-ID-LC/MS	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%
			ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL			
候補（1）（HECTEF）	1	AS1-1	1.66	1.66	1.10	0.87	1.04	0.80	1.30	1.08	1.2	0.94	1.08	1.12	1.05	0.15	14%
	2	AS1-2	4.52	4.52	2.43	2.40	2.57	2.28	3.17	2.91	3.01	2.76	3.15	2.99	2.77	0.33	12%
	3	AS1-3	7.62	7.62	3.30	3.94	4.11	3.85	4.76	4.44	4.85	4.15	5.16	4.67	4.32	0.56	13%
	4	C1-1	---	---	0.78	0.45	0.62	0.45	0.90	0.62	0.72	0.77	0.50	0.63	0.64	0.15	23%
	5	C1-2	---	---	2.58	1.61	3.80	2.22	2.47	3.00	2.52	4.91	2.73	2.35	2.82	0.92	33%
	6	PS1	8.49	8.49	3.26	3.96	4.59	3.96	4.50	4.79	4.84	4.98	>6	4.36	4.36	0.55	13%
候補（2）（A社CAL）（液状）	7	Cal-1	0.736	---	0.60	0.44	0.58	0.54	0.72	0.51	0.709	0.84	0.60	0.60	0.61	0.12	19%
	8	Cal-2	3.35	---	2.80	2.94	2.93	2.37	3.26	3.36	3.26	4.44	3.60	3.40	3.23	0.55	17%
候補（3）（B社CAL）（凍結乾燥）	9	Cal-1	0	---	< 0.40	<0.08	0.00	<0.15	<0.08	0.00	0.059	0.08	<0.25	<0.10			
	10	Cal-2	0.431	---	0.49	0.42	0.64	0.42	0.88	0.43	0.701	0.89	0.36	0.46	0.57	0.20	35%
	11	Cal-3	1.04	---	0.97	0.84	1.24	0.94	1.56	1.05	1.33	1.94	0.82	1.07	1.18	0.35	30%
	12	Cal-4	1.99	---	1.65	1.62	2.32	1.63	2.60	1.97	2.28	3.46	1.63	1.96	2.11	0.59	28%
	13	Cal-5	4.3	---	3.12	3.43	4.47	3.95	5.12	4.28	4.95	5.34	3.72	4.21	4.26	0.73	17%
	14	Cal-6	9.52	---	> 6.00	>5.44	7.74	>5.64	>9.32	9.71	>7.77	＞6.99	>6.00	>10.00			

2．実検体

実検体	連番	ID	理論濃度	ED-ID-LC/MS	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%
			ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL			
プール血清（臨床検体）	15	A	---	---	0.53	0.28	0.53	0.32	0.54	0.39	0.471	0.37	0.28	0.32	0.40	0.11	26%
	16	B	---	---	0.99	0.41	0.79	0.40	0.71	0.53	0.644	0.53	0.42	0.52	0.59	0.19	32%
	17	C	---	---	1.08	0.66	1.18	0.65	1.01	0.95	1.02	0.96	0.71	0.89	0.91	0.18	20%
	18	D	---	---	1.16	0.90	1.60	0.84	1.11	1.20	1.16	1.29	0.88	0.94	1.11	0.23	21%
	19	E	---	---	1.47	0.95	1.94	0.99	1.33	1.51	1.42	1.62	1.15	1.20	1.36	0.30	22%
	20	F	---	---	1.27	1.01	1.89	1.02	1.29	1.46	1.44	1.73	1.15	1.14	1.34	0.29	22%
	21	G	---	---	1.39	1.02	1.98	1.09	1.44	1.55	1.53	1.81	1.25	1.39	1.45	0.30	20%
	22	H	---	---	1.55	1.18	2.44	1.25	1.59	1.84	1.7	2.21	1.42	1.64	1.68	0.40	24%
	23	I	---	---	1.67	1.36	2.33	1.35	1.68	1.89	1.83	2.31	1.53	1.58	1.75	0.35	20%
	24	J	---	---	1.70	1.42	2.50	1.52	1.82	2.09	1.93	2.61	1.74	2.04	1.94	0.39	20%
	25	K	---	---	1.99	1.50	2.63	1.62	1.85	2.24	2.1	2.84	1.86	1.94	2.06	0.42	20%
	26	L	---	---	2.81	2.50	4.70	2.86	2.88	3.79	3.3	4.76	2.98	3.05	3.36	0.80	24%
	27	M	---	---	2.82	2.71	5.24	3.22	3.18	4.22	4.13	5.21	3.37	3.32	3.74	0.92	25%
	28	N	---	---	3.67	3.82	5.93	4.05	3.99	5.17	4.83	6.11	4.39	4.26	4.62	0.86	19%
	29	O	---	---	4.29	4.67	7.39	4.72	4.93	6.45	6.27	6.99	5.79	5.70	5.72	1.05	18%
	30	P	---	---	4.93	>5.44	7.40	4.83	5.72	7.46	>7.77	＞6.99	>6.00	6.63			
シングルドナー血清	31	SD-1	---	1.93	1.04	1.05	1.25	0.94	1.56	1.24	1.31	1.34	1.15	1.20	1.21	0.18	15%
	32	SD-2	---	1.47	1.08	0.92	1.10	0.74	1.21	1.06	1.16	1.00	0.79	0.97	1.00	0.15	15%
	33	SD-3	---	3.55	1.52	1.21	2.20	1.54	1.71	1.70	1.61	2.54	1.39	1.31	1.67	0.41	24%
	34	SD-4	---	---	1.56	1.01	3.14	1.34	1.57	1.86	1.76	2.94	1.57	1.25	1.80	0.70	39%
	35	SD-5	---	---	1.10	1.05	1.19	0.81	1.14	1.15	1.25	1.16	0.88	0.97	1.07	0.14	13%
																CV平均	22%

資料４

【1】-２：キット間差の現状-----全キットの平均値との比

サンプルの種類や濃度域によっても異なるが、最も差が少ないサンプルでも平均値との比が82～115%（最大33%）の開きが、差の最も大きいサンプルでは平均値との比が56～174%（最大118%）の開きがみられた。

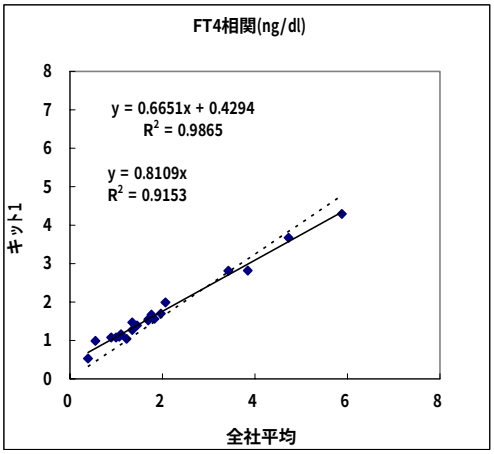
サンプル種別	連番	ID	濃度（平均）	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	最小値	最大値
			ng/dL	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
候補（1）（HECTEF）	1	AS1-1	1.05	104%	83%	99%	76%	123%	102%	114%	89%	103%	106%	76%	123%
	2	AS1-2	2.77	88%	87%	93%	82%	115%	105%	109%	100%	114%	108%	82%	115%
	3	AS1-3	4.32	76%	91%	95%	89%	110%	103%	112%	96%	119%	108%	76%	119%
	4	C1-1	0.64	121%	70%	96%	70%	140%	97%	112%	119%	78%	98%	70%	140%
	5	C1-2	2.82	92%	57%	135%	79%	88%	106%	89%	174%	97%	83%	57%	174%
	6	PS1	4.36	75%	91%	105%	91%	103%	110%	111%	114%	---	100%	75%	114%
候補（2）（A社CAL）（液状）	7	Cal-1	0.61	98%	72%	94%	88%	117%	83%	115%	137%	98%	98%	72%	137%
	8	Cal-2	3.23	86%	91%	91%	73%	101%	104%	101%	137%	111%	105%	73%	137%
候補（3）（B社CAL）（凍結乾燥）	9	Cal-1	0.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	10	Cal-2	0.57	86%	73%	113%	74%	155%	75%	123%	157%	63%	81%	63%	157%
	11	Cal-3	1.18	83%	72%	105%	80%	133%	89%	113%	165%	70%	91%	70%	165%
	12	Cal-4	2.11	78%	77%	110%	77%	123%	93%	108%	164%	77%	93%	77%	164%
	13	Cal-5	4.26	73%	80%	105%	93%	120%	101%	116%	125%	87%	99%	73%	125%
	14	Cal-6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
プール血清（臨床検体）	15	A	0.40	131%	69%	131%	79%	134%	98%	117%	92%	69%	79%	69%	134%
	16	B	0.59	166%	69%	133%	67%	119%	90%	108%	89%	71%	87%	67%	166%
	17	C	0.91	118%	73%	129%	71%	111%	105%	112%	105%	78%	98%	71%	129%
	18	D	1.11	105%	81%	144%	76%	100%	108%	105%	116%	79%	85%	76%	144%
	19	E	1.36	108%	70%	143%	73%	98%	111%	105%	119%	85%	88%	70%	143%
	20	F	1.34	95%	75%	141%	76%	96%	109%	108%	129%	86%	85%	75%	141%
	21	G	1.45	96%	71%	137%	75%	100%	107%	106%	125%	86%	96%	71%	137%
	22	H	1.68	92%	70%	145%	74%	95%	109%	101%	131%	84%	98%	70%	145%
	23	I	1.75	95%	78%	133%	77%	96%	108%	104%	132%	87%	90%	77%	133%
	24	J	1.94	88%	73%	129%	78%	94%	108%	100%	135%	90%	105%	73%	135%
	25	K	2.06	97%	73%	128%	79%	90%	109%	102%	138%	90%	94%	73%	138%
	26	L	3.36	84%	74%	140%	85%	86%	113%	98%	142%	89%	91%	74%	142%
	27	M	3.74	75%	72%	140%	86%	85%	113%	110%	139%	90%	89%	72%	140%
	28	N	4.62	79%	83%	128%	88%	86%	112%	105%	132%	95%	92%	79%	132%
	29	O	5.72	75%	82%	129%	83%	86%	113%	110%	122%	101%	100%	75%	129%
	30	P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
シングルドナー血清	31	SD-1	1.21	86%	87%	103%	78%	129%	102%	108%	111%	95%	99%	78%	129%
	32	SD-2	1.00	108%	91%	110%	74%	121%	106%	116%	100%	79%	97%	74%	121%
	33	SD-3	1.67	91%	72%	131%	92%	102%	102%	96%	152%	83%	78%	72%	152%
	34	SD-4	1.80	87%	56%	174%	74%	87%	103%	98%	163%	87%	69%	56%	174%
	35	SD-5	1.07	103%	98%	111%	76%	107%	107%	117%	108%	82%	91%	76%	117%

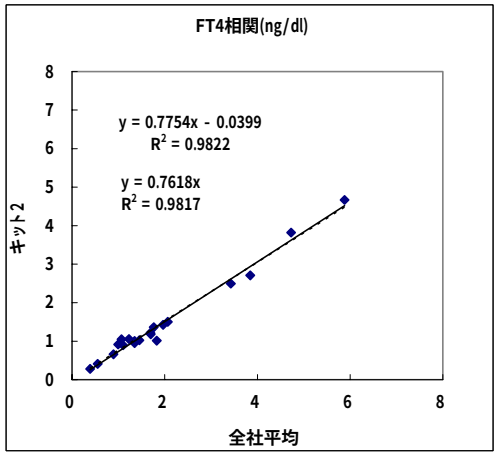
資料５-1

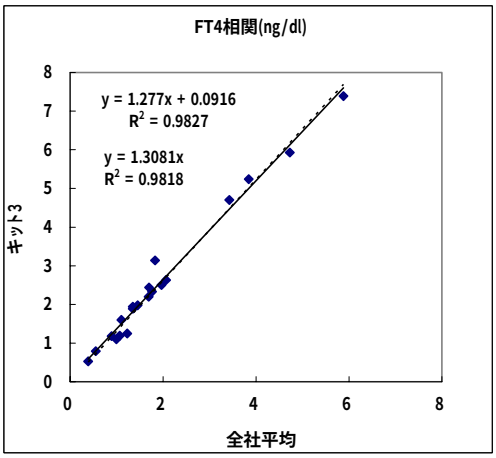
【1】-3：キット間差の現状-----全社平均に対する各キットの相関性（全濃度域）

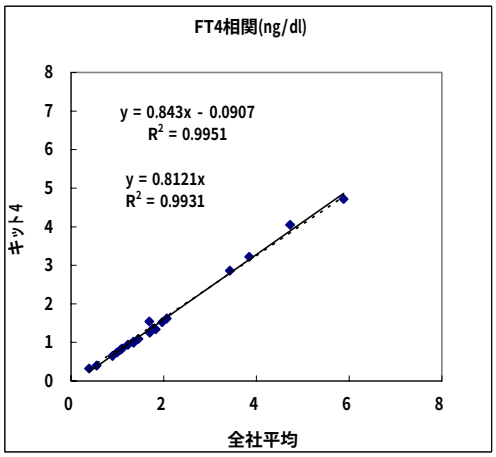
実検体（プール血清15例、シングルドナー血清５例）での相関図を作成した。
なお、グラフ中には通常の回帰式を上段、y切片=0とした回帰式を下段に示した。

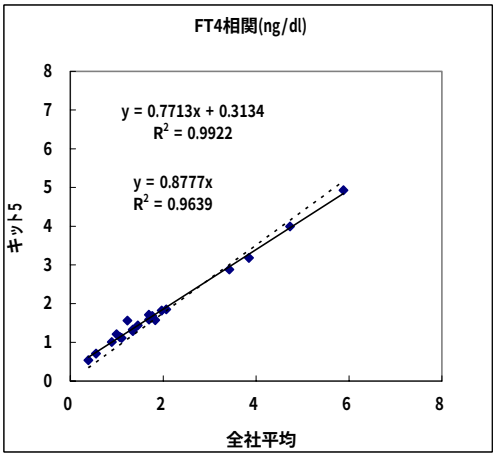
回帰式の傾きは、0.76～1.31となり、キット間差は最大で55%であった。

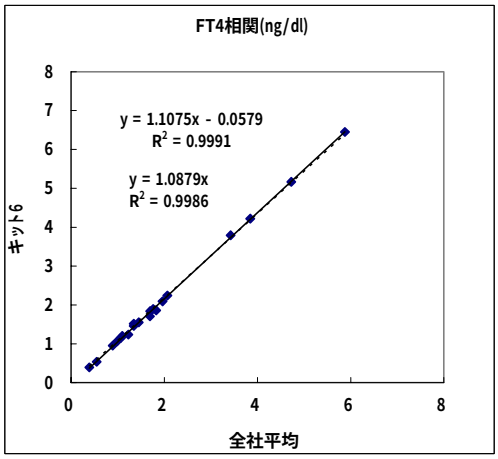




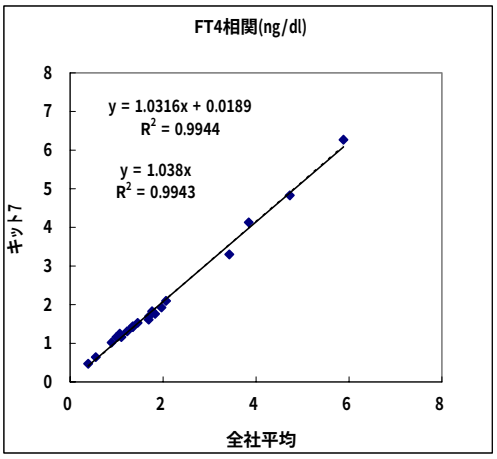


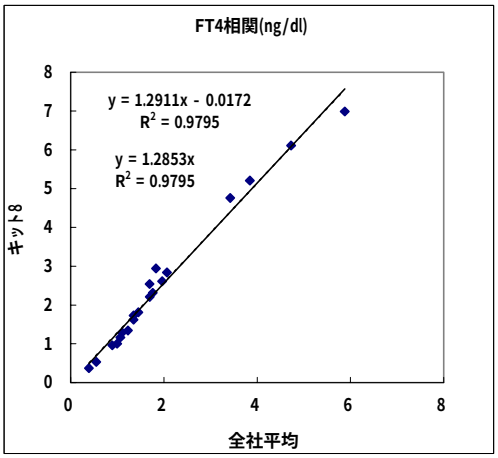


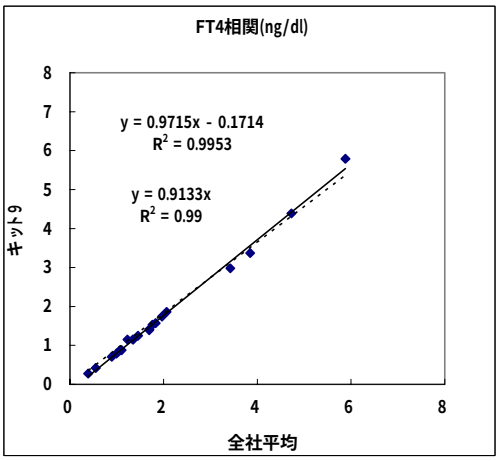


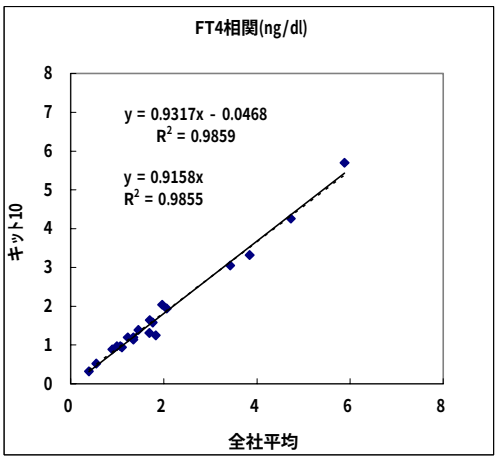


資料５-2





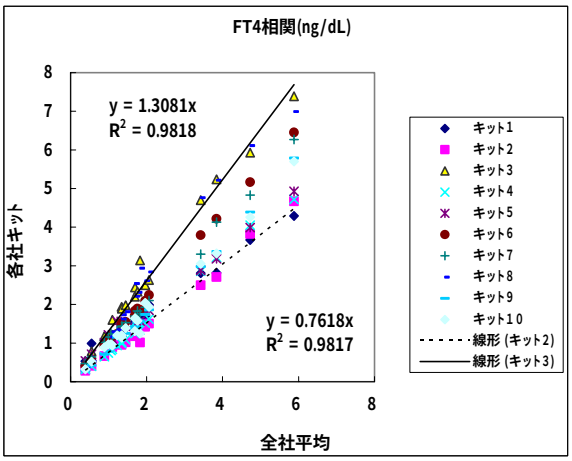




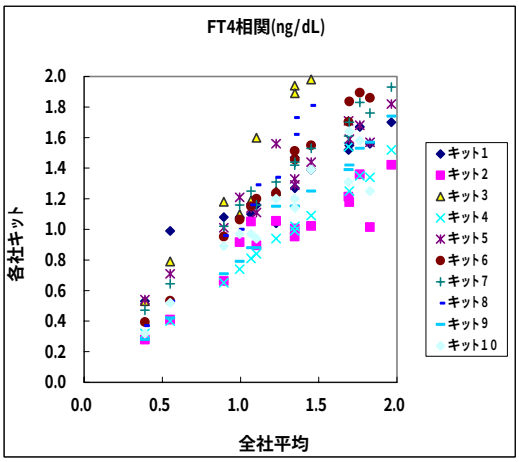
●まとめ：実検体の相関性（現状）

回帰式は最大と最小のキットのみ表示（y切片＝0として回帰）

（全濃度域）



（低濃度～正常域）

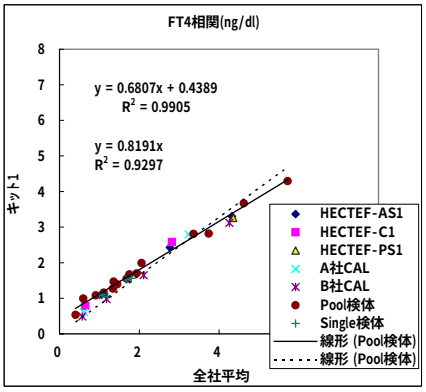


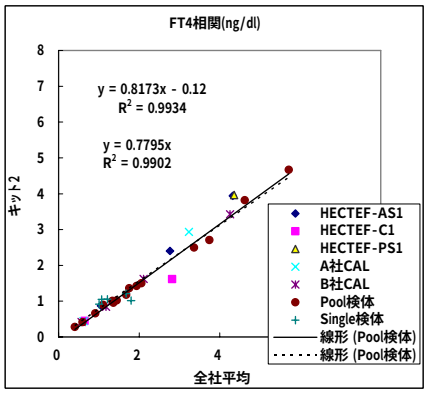
【1】-4-1：サンプルの種類別の相関図-----全社平均に対する各キットの相関性（全濃度域）

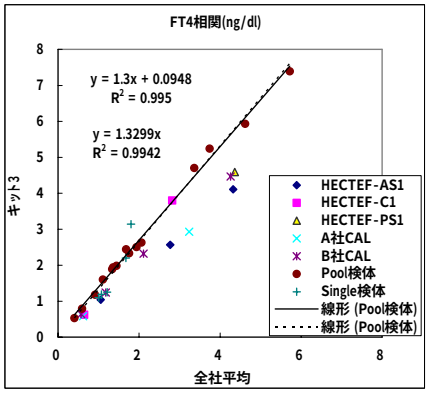
以下の7種のサンプル別に相関図を作成した。
ただし、回帰式は⑥Pool検体のみで算出し、通常の回帰式を上段、y切片=0とした回帰式を下段に示した。

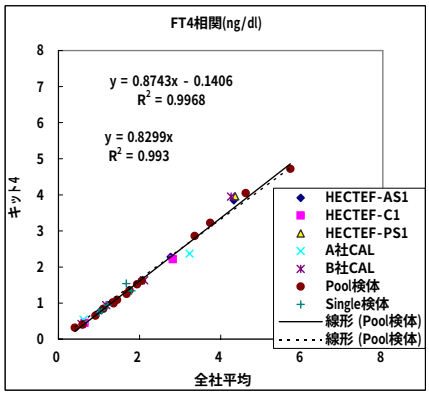
①HECTEF-AS1（血清標準物質候補品：新鮮プール血清にT4を添加、AS1-1はベースのため未添加）
②HECTEF-C1（血清管理物質候補品：凍結乾燥コントロール）
③HECTEF-PS1（新鮮プール血清）
④A社CAL（A社の製品キャリブレータ：血清ベースにT4添加、液状品、その他の情報は非公表）
⑤B社CAL（B社の製品キャリブレータ：血清ベースにT4添加、凍結乾燥品、その他の情報は非公表）
⑥Pool検体（プール血清）
⑦Single検体（シングルドナー血清）

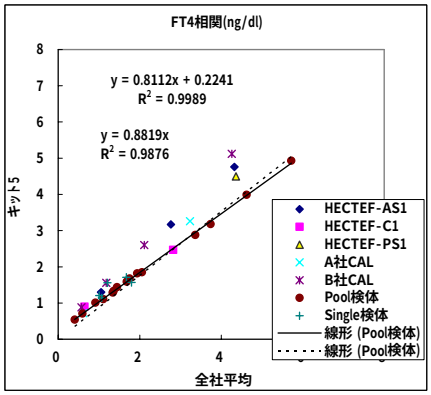
グラフに示したように、サンプルの種類によってキット間に差がみられた。
Pool検体を基準とした場合、特にT4を添加した人工的なサンプルでは差が大きくなる傾向がみられた。
共にT4を添加していないPool検体とSingle検体間でも差がみられる場合もあり、Pool検体では個体差が平均化されているのに対して、Single検体では個体差の影響が考えられた。
HECTEF-PS1はプール血清であるが、キットによっては他のプール血清と乖離する傾向が確認された。
原因は不明であるが、プールした検体の中に抗T4自己抗体や異好抗体などの非特異的な要因が含まれていた可能性も否定できない。

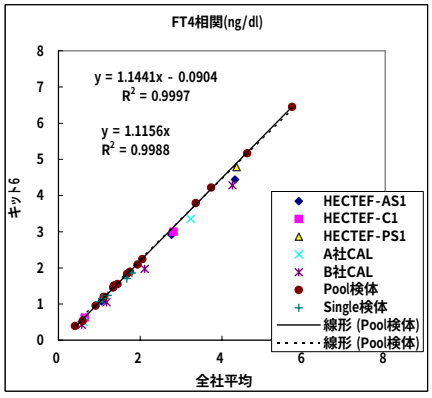




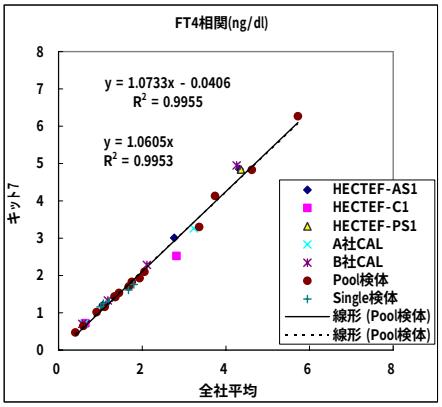


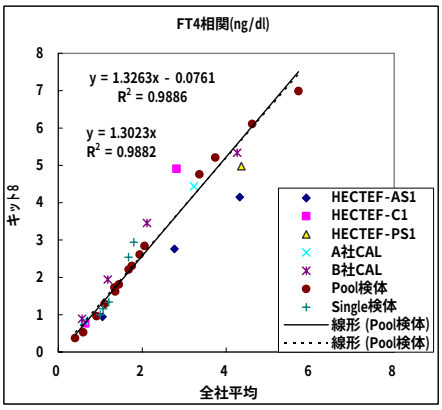


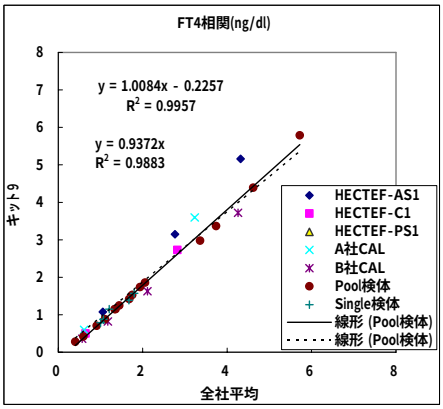


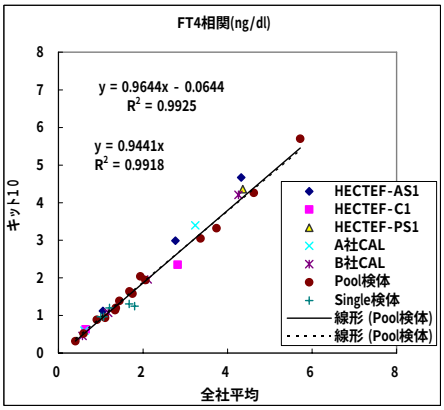


資料６-２


FT4相関(ng/dl)
y = 1.0733x - 0.0406
R2 = 0.9955
y = 1.0605x
R2 = 0.9953
キット7
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)


FT4相関(ng/dl)
y = 1.3263x - 0.0761
R2 = 0.9886
y = 1.3023x
R2 = 0.9882
キット8
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)


FT4相関(ng/dl)
y = 1.0084x - 0.2257
R2 = 0.9957
y = 0.9372x
R2 = 0.9883
キット9
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)


FT4相関(ng/dl)
y = 0.9644x - 0.0644
R2 = 0.9925
y = 0.9441x
R2 = 0.9918
キット10
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)

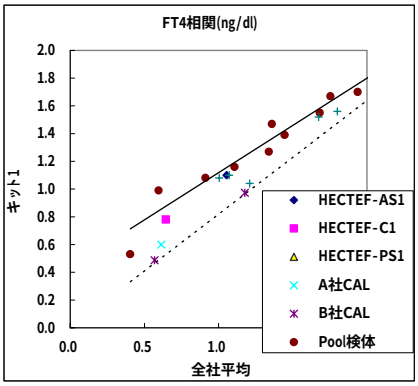
資料７-1

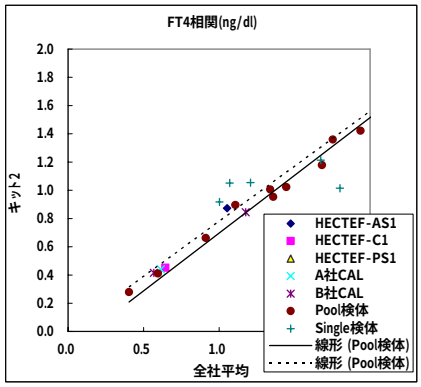
【1】-4-2：サンプルの種類別の相関図-----全社平均に対する各キットの相関性（低濃度～正常域の拡大図）

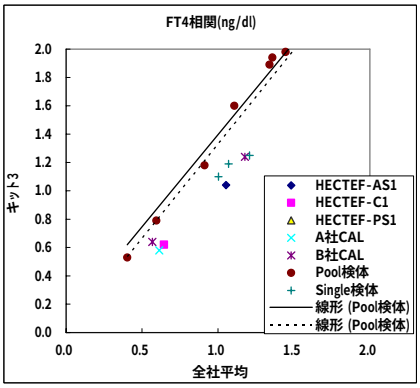
以下の7種のサンプル別に相関図を作成した。ただし、グラフ中の回帰直線は⑥Pool検体の全データを用いて作成したもので、通常の回帰直線を実線、y切片=0とした回帰直線を点線で示した。

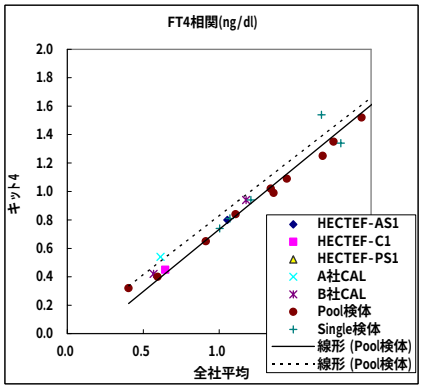
①HECTEF-AS1（血清標準物質候補品：新鮮プール血清にT4を添加、AS1-1はベースのため未添加）
②HECTEF-C1（血清管理物質候補品：凍結乾燥コントロール）
③HECTEF-PS1（新鮮プール血清）
④A社CAL（A社の製品キャリブレータ：血清ベースにT4添加、液状品、その他の情報は非公表）
⑤B社CAL（B社の製品キャリブレータ：血清ベースにT4添加、凍結乾燥品、その他の情報は非公表）
⑥Pool検体（プール血清）
⑦Single検体（シングルドナー血清）

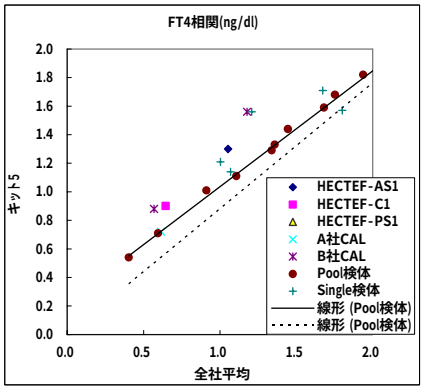
以下のグラフに示したように、サンプルの種類によってキット間に差がみられた。
Pool検体を基準とした場合、特にT4を添加した人工的なサンプルでは差が大きくなる傾向がみられた。
なお、共にT4を添加していないPool検体とSingle検体間で差がみられる場合もあり、Pool検体では個体差が平均化されているのに対して、Single検体では個体差が生じている可能性が考えられた。

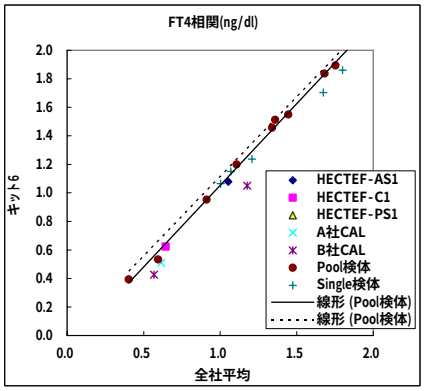




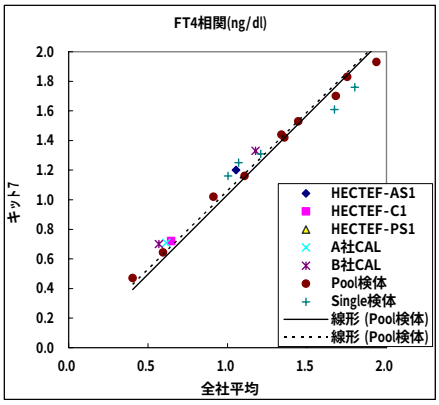


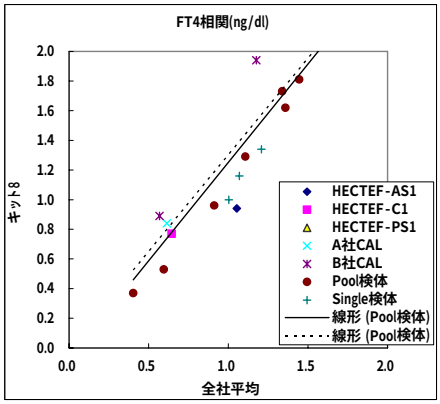


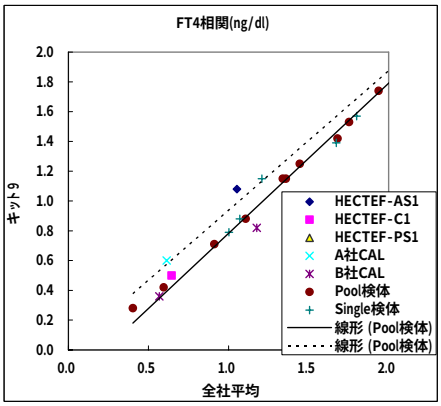


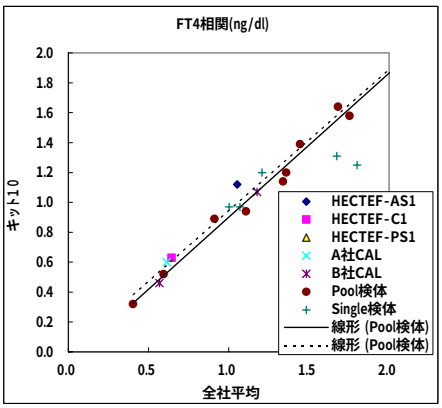


資料７-2


FT4相関(ng/dl)
キット7
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)


FT4相関(ng/dl)
キット8
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)


FT4相関(ng/dl)
キット9
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)


FT4相関(ng/dl)
キット10
全社平均
HECTEF-AS1
HECTEF-C1
HECTEF-PS1
A社CAL
B社CAL
Pool検体
Single検体
線形 (Pool検体)
線形 (Pool検体)

資料８

【2】-1：標準品候補による較正-----候補1

候補1：HECTEF-AS1（血清標準物質候補品：新鮮プール血清にT4を添加、AS1-1はベースのため未添加）
較正方法：候補1の理論濃度と各キットの測定値の相関（y切片＝0）の傾きから補正係数を算出し、各キットの測定値を補正した。

較正によって、実検体ではCV平均は較正前の22%から25%に上昇し、キット間の収束性は改善しなかった。

回帰式の傾きは、0.79～1.40となり、キット間差は最大で61%となった。

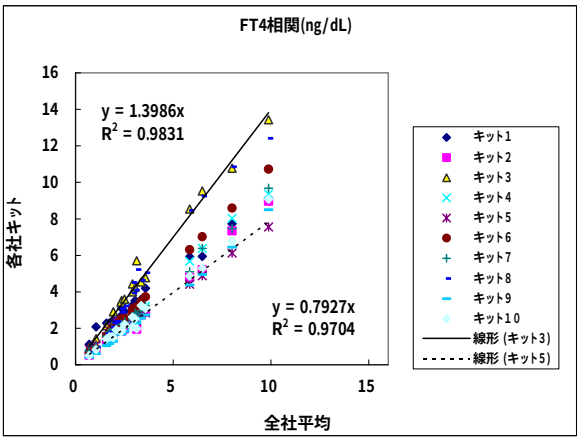
[候補1による較正後]

	連番	ID	理論濃度	補正係数	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
			ng/dL		2.108	1.920	1.817	1.983	1.534	1.662	1.545	1.775	1.468	1.592					
			ng/dL		ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL					
候補（1）（HECTEF）	1	AS1-1	1.66		2.32	1.68	1.89	1.59	1.99	1.79	1.85	1.67	1.59	1.78	1.81	0.22	12%	2.32	1.59
	2	AS1-2	4.52		5.12	4.61	4.67	4.52	4.86	4.84	4.65	4.90	4.62	4.76	4.76	0.18	4%	5.12	4.52
	3	AS1-3	7.62		6.96	7.56	7.47	7.63	7.30	7.38	7.49	7.37	7.57	7.44	7.42	0.19	3%	7.63	6.96
	4	C1-1	-		1.64	0.87	1.13	0.89	1.38	1.04	1.11	1.37	0.73	1.00	1.12	0.28	25%	1.64	0.73
	5	C1-2	-		5.44	3.10	6.90	4.40	3.79	4.98	3.89	8.72	4.01	3.74	4.90	1.72	35%	8.72	3.10
	6	PS1	-		6.87	7.61	8.34	7.85	6.90	7.96	7.48	8.84	-	6.94	7.64	0.68	9%	8.84	6.87
候補（2）（A社）	7	Cal-1	0.736		1.26	0.85	1.05	1.07	1.10	0.85	1.10	1.49	0.88	0.96	1.06	0.20	19%	1.49	0.85
	8	Cal-2	3.35		5.90	5.64	5.32	4.70	5.00	5.58	5.04	7.88	5.28	5.41	5.57	0.88	16%	7.88	4.70
候補（3）（B社）	9	Cal-1	0		-	-	0.00	-	-	0.00	0.09	0.14	-	-	-	-	-	0.14	0.00
	10	Cal-2	0.431		1.03	0.80	1.16	0.83	1.35	0.71	1.08	1.58	0.53	0.73	0.98	0.32	33%	1.58	0.53
	11	Cal-3	1.04		2.05	1.62	2.25	1.86	2.39	1.75	2.05	3.44	1.20	1.70	2.03	0.60	30%	3.44	1.20
	12	Cal-4	1.99		3.47	3.11	4.22	3.23	3.99	3.28	3.52	6.14	2.39	3.12	3.65	1.01	28%	6.14	2.39
	13	Cal-5	4.3		6.57	6.58	8.12	7.83	7.85	7.11	7.65	9.48	5.46	6.70	7.34	1.10	15%	9.48	5.46
	14	Cal-6	9.52		-	-	14.06	-	-	16.13	-	-	-	-					

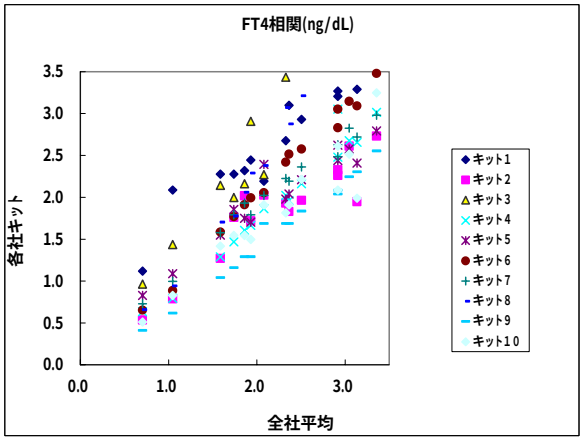
実検体	連番	ID		平均	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
プール血清	15	A	-	0.70	1.12	0.54	0.96	0.63	0.83	0.65	0.73	0.66	0.41	0.51	0.70	0.21	31%	1.12	0.41
	16	B	-	1.05	2.09	0.79	1.44	0.79	1.09	0.89	0.99	0.94	0.62	0.83	1.05	0.43	41%	2.09	0.62
	17	C	-	1.59	2.28	1.27	2.14	1.29	1.55	1.58	1.58	1.70	1.04	1.42	1.59	0.38	24%	2.28	1.04
	18	D	-	1.93	2.45	1.72	2.91	1.67	1.70	1.99	1.79	2.29	1.29	1.50	1.93	0.49	25%	2.91	1.29
	19	E	-	2.36	3.10	1.83	3.53	1.96	2.04	2.52	2.19	2.88	1.69	1.91	2.36	0.62	26%	3.53	1.69
	20	F	-	2.33	2.68	1.93	3.43	2.02	1.98	2.42	2.22	3.07	1.69	1.82	2.33	0.57	25%	3.43	1.69
	21	G	-	2.51	2.93	1.96	3.60	2.16	2.21	2.58	2.36	3.21	1.83	2.21	2.51	0.57	23%	3.60	1.83
	22	H	-	2.92	3.27	2.26	4.43	2.48	2.44	3.05	2.63	3.92	2.08	2.61	2.92	0.76	26%	4.43	2.08
	23	I	-	3.05	3.52	2.61	4.23	2.68	2.58	3.15	2.83	4.10	2.25	2.52	3.05	0.69	23%	4.23	2.25
	24	J	-	3.36	3.58	2.73	4.54	3.01	2.79	3.48	2.98	4.63	2.55	3.25	3.36	0.72	22%	4.63	2.55
	25	K	-	3.57	4.20	2.88	4.78	3.21	2.84	3.73	3.24	5.04	2.73	3.09	3.57	0.83	23%	5.04	2.73
	26	L	-	5.84	5.92	4.79	8.54	5.67	4.42	6.30	5.10	8.45	4.37	4.86	5.84	1.53	26%	8.54	4.37
	27	M	-	6.48	5.94	5.20	9.52	6.39	4.88	7.01	6.38	9.25	4.95	5.29	6.48	1.68	26%	9.52	4.88
	28	N	-	8.01	7.74	7.34	10.78	8.03	6.12	8.59	7.46	10.85	6.44	6.78	8.01	1.65	21%	10.85	6.12
	29	O	-	9.87	9.04	8.97	13.43	9.36	7.56	10.72	9.69	12.41	8.50	9.08	9.87	1.81	18%	13.43	7.56
	30	P	-												-	-	-	-	-
シングルドナー血清	31	SD-1	-	2.08	2.19	2.02	2.27	1.86	2.39	2.06	2.02	2.38	1.69	1.91	2.08	0.23	11%	2.39	1.69
	32	SD-2	-	1.74	2.28	1.76	2.00	1.47	1.86	1.77	1.79	1.78	1.16	1.54	1.74	0.30	17%	2.28	1.16
	33	SD-3	-	2.92	3.20	2.33	4.00	3.05	2.62	2.83	2.49	4.51	2.04	2.09	2.92	0.81	28%	4.51	2.04
	34	SD-4	-	3.13	3.29	1.95	5.71	2.66	2.41	3.09	2.72	5.22	2.30	1.99	3.13	1.30	42%	5.71	1.95
	35	SD-5	-	1.86	2.32	2.02	2.16	1.61	1.75	1.91	1.93	2.06	1.29	1.54	1.86	0.31	17%	2.32	1.29
																CV平均	25%		

●まとめ：実検体の相関性（標準品候補1による較正後）
回帰式は最大と最小のキットのみ表示
y切片＝0として回帰

（全濃度域）



（低濃度～正常域）



資料９

【2】-２：標準品候補による較正-----候補２

候補２：A社の製品キャリブレータ（血清ベースにT4添加、液状品、その他の詳細情報は非公表）
較正方法：候補２の理論濃度と各キットの測定値の相関（y切片＝０）の傾きから補正係数を算出し、各キットの測定値を補正した。

較正によって標準品候補２のキット間差（CV）は低下したが、実検体ではCV平均は較正前の22%と変わらず
キット間の収束性は改善しなかった。

回帰式の傾きは、0.83～1.45となり、キット間差は最大で62%となった。

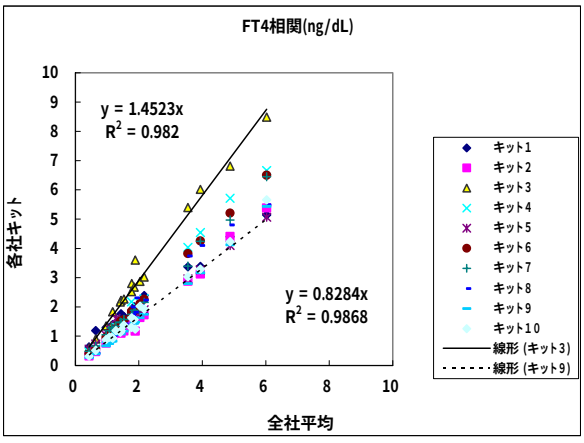
[候補2による較正後]

	連番	ID	理論濃度		キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
				補正係数	1.199	1.153	1.148	1.411	1.027	1.008	1.028	0.786	0.939	0.993					
			ng/dL		ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL					
候補（1）(HECTEF)	1	AS1-1	1.66		1.32	1.01	1.19	1.13	1.34	1.09	1.23	0.74	1.01	1.11	1.12	0.17	16%	1.34	0.74
	2	AS1-2	4.52		2.91	2.77	2.95	3.22	3.26	2.93	3.09	2.17	2.96	2.97	2.92	0.30	10%	3.26	2.17
	3	AS1-3	7.62		3.96	4.54	4.72	5.43	4.89	4.48	4.99	3.26	4.84	4.64	4.57	0.60	13%	5.43	3.26
	4	C1-1	-		0.94	0.52	0.71	0.63	0.92	0.63	0.74	0.60	0.47	0.63	0.68	0.15	23%	0.94	0.47
	5	C1-2	-		3.09	1.86	4.36	3.13	2.54	3.02	2.59	3.86	2.56	2.33	2.94	0.74	25%	4.36	1.86
	6	PS1	-		3.91	4.57	5.27	5.59	4.62	4.83	4.98	3.91	-	4.33	4.67	0.57	12%	5.59	3.91
候補（2）(A社)	7	Cal-1	0.736		0.72	0.51	0.67	0.76	0.74	0.51	0.73	0.66	0.56	0.60	0.65	0.09	15%	0.76	0.51
	8	Cal-2	3.35		3.35	3.38	3.36	3.34	3.35	3.38	3.35	3.49	3.38	3.37	3.38	0.04	1%	3.49	3.34
候補（3）(B社)	9	Cal-1	0		-	-	0.00	-	-	0.00	0.06	0.06	-	-				0.06	0.00
	10	Cal-2	0.431		0.58	0.48	0.73	0.59	0.90	0.43	0.72	0.70	0.34	0.46	0.59	0.17	29%	0.90	0.34
	11	Cal-3	1.04		1.17	0.97	1.42	1.33	1.60	1.06	1.37	1.52	0.77	1.06	1.23	0.26	22%	1.60	0.77
	12	Cal-4	1.99		1.97	1.87	2.66	2.30	2.67	1.99	2.34	2.72	1.53	1.95	2.20	0.40	18%	2.72	1.53
	13	Cal-5	4.3		3.74	3.95	5.13	5.57	5.26	4.31	5.09	4.20	3.49	4.18	4.49	0.72	16%	5.57	3.49
	14	Cal-6	9.52		-	-	8.89	-	-	9.79	-	-	-	-					

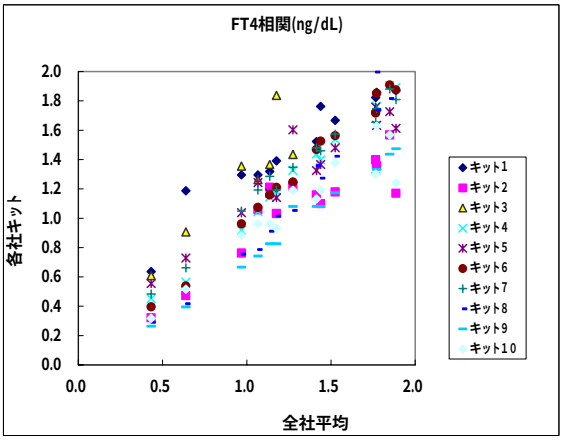
実検体	連番	ID		平均	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
プール血清	15	A	-	0.43	0.64	0.32	0.61	0.45	0.55	0.40	0.48	0.29	0.26	0.32	0.43	0.14	31%	0.64	0.26
	16	B	-	0.64	1.19	0.47	0.91	0.56	0.73	0.54	0.66	0.42	0.39	0.52	0.64	0.25	39%	1.19	0.39
	17	C	-	0.97	1.30	0.76	1.35	0.92	1.04	0.96	1.05	0.75	0.67	0.88	0.97	0.23	23%	1.35	0.67
	18	D	-	1.18	1.39	1.03	1.84	1.19	1.14	1.21	1.19	1.01	0.83	0.93	1.18	0.28	24%	1.84	0.83
	19	E	-	1.44	1.76	1.10	2.23	1.40	1.37	1.53	1.46	1.27	1.08	1.19	1.44	0.35	24%	2.23	1.08
	20	F	-	1.41	1.52	1.16	2.17	1.44	1.33	1.47	1.48	1.36	1.08	1.13	1.41	0.31	22%	2.17	1.08
	21	G	-	1.52	1.67	1.18	2.27	1.54	1.48	1.56	1.57	1.42	1.17	1.38	1.52	0.31	20%	2.27	1.17
	22	H	-	1.77	1.86	1.36	2.80	1.76	1.63	1.85	1.75	1.74	1.33	1.63	1.77	0.41	23%	2.80	1.33
	23	I	-	1.85	2.00	1.57	2.68	1.90	1.73	1.91	1.88	1.81	1.44	1.57	1.85	0.34	19%	2.68	1.44
	24	J	-	2.04	2.04	1.64	2.87	2.14	1.87	2.11	1.98	2.05	1.63	2.02	2.04	0.34	17%	2.87	1.63
	25	K	-	2.16	2.39	1.73	3.02	2.29	1.90	2.26	2.16	2.23	1.75	1.93	2.16	0.38	18%	3.02	1.73
	26	L	-	3.54	3.37	2.88	5.40	4.04	2.96	3.82	3.39	3.74	2.80	3.03	3.54	0.78	22%	5.40	2.80
	27	M	-	3.94	3.38	3.12	6.02	4.54	3.27	4.25	4.25	4.09	3.16	3.30	3.94	0.90	23%	6.02	3.12
	28	N	-	4.88	4.40	4.41	6.81	5.71	4.10	5.21	4.97	4.80	4.12	4.23	4.88	0.86	18%	6.81	4.10
	29	O	-	6.03	5.14	5.38	8.48	6.66	5.07	6.50	6.45	5.49	5.43	5.66	6.03	1.04	17%	8.48	5.07
	30	P	-																
シングルドナー血清	31	SD-1	-	1.27	1.25	1.22	1.44	1.33	1.60	1.25	1.35	1.05	1.08	1.19	1.27	0.16	13%	1.60	1.05
	32	SD-2	-	1.07	1.30	1.06	1.26	1.04	1.24	1.07	1.19	0.79	0.74	0.96	1.07	0.19	18%	1.30	0.74
	33	SD-3	-	1.76	1.82	1.40	2.53	2.17	1.76	1.72	1.66	2.00	1.30	1.30	1.76	0.39	22%	2.53	1.30
	34	SD-4	-	1.89	1.87	1.17	3.61	1.89	1.61	1.88	1.81	2.31	1.47	1.24	1.89	0.69	37%	3.61	1.17
	35	SD-5	-	1.14	1.32	1.21	1.37	1.14	1.17	1.16	1.29	0.91	0.83	0.96	1.14	0.18	16%	1.37	0.83
																CV平均	22%		

●実検体の相関性まとめ（標準品候補2による較正後）
回帰式は最大と最小のキットのみ表示
y切片＝0として回帰

（全濃度域）



（低濃度～正常域）



資料 10

【2】-3：標準品候補による較正-----候補3

候補3：B社の製品キャリブレータ（血清ベースにT4添加、凍結乾燥品、その他の詳細情報は非公表）
較正方法：候補3の理論濃度と各キットの測定値の相関（y切片＝0）の傾きから補正係数を算出し、各キットの測定値を補正した。

較正によって標準品候補1のキット間差（CV）は低下したが、実検体ではCV平均は較正前の22%から24%に上昇し、
キット間の収束性は改善しなかった。

回帰式の傾きは、0.71～1.49となり、キット間差は最大で78%となった。

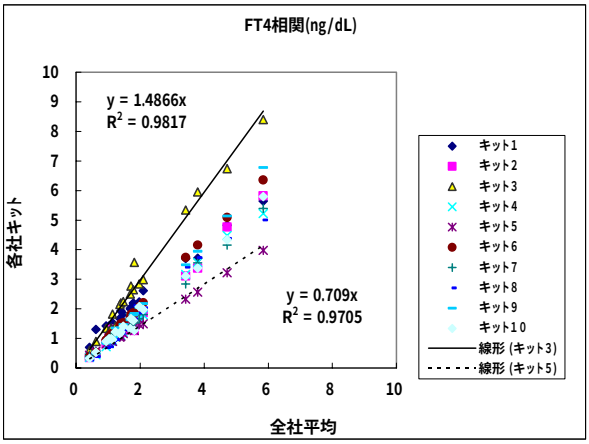
【候補3による較正値】

	連番	ID	理論濃度	補正係数	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
					1.315	1.247	1.136	1.107	0.807	0.986	0.861	0.716	1.171	1.017					
			ng/dL		ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL					
候補（1）(HECTEF)	1	AS1-1	1.66		1.45	1.09	1.18	0.89	1.05	1.06	1.03	0.67	1.26	1.14	1.08	0.21	19%	1.45	0.67
	2	AS1-2	4.52		3.20	2.99	2.92	2.52	2.56	2.87	2.59	1.98	3.69	3.04	2.84	0.46	16%	3.69	1.98
	3	AS1-3	7.62		4.34	4.91	4.67	4.26	3.84	4.38	4.17	2.97	6.04	4.75	4.43	0.79	18%	6.04	2.97
	4	C1-1	-		1.03	0.56	0.70	0.50	0.73	0.61	0.62	0.55	0.59	0.64	0.65	0.15	23%	1.03	0.50
	5	C1-2	-		3.39	2.01	4.32	2.46	1.99	2.95	2.17	3.52	3.20	2.39	2.84	0.77	27%	4.32	1.99
	6	PS1	-		4.29	4.94	5.21	4.38	3.63	4.72	4.17	3.57	-	4.43	4.37	0.55	13%	5.21	3.57
候補（2）(A社)	7	Cal-1	0.736		0.79	0.55	0.66	0.60	0.58	0.50	0.61	0.60	0.70	0.61	0.62	0.08	13%	0.79	0.50
	8	Cal-2	3.35		3.68	3.66	3.33	2.62	2.63	3.31	2.81	3.18	4.21	3.46	3.29	0.51	15%	4.21	2.62
候補（3）(B社)	9	Cal-1	0		-	-	0.00	-	-	0.00	0.05	0.06	-	-				0.06	0.00
	10	Cal-2	0.431		0.64	0.52	0.73	0.46	0.71	0.42	0.60	0.64	0.42	0.47	0.56	0.12	21%	0.73	0.42
	11	Cal-3	1.04		1.28	1.05	1.41	1.04	1.26	1.03	1.14	1.39	0.96	1.09	1.17	0.16	14%	1.41	0.96
	12	Cal-4	1.99		2.17	2.02	2.64	1.80	2.10	1.94	1.96	2.48	1.91	1.99	2.10	0.26	12%	2.64	1.80
	13	Cal-5	4.3		4.10	4.27	5.08	4.37	4.13	4.22	4.26	3.82	4.35	4.28	4.29	0.32	7%	5.08	3.82
	14	Cal-6	9.52		-	-	8.79	-	-	9.57	-	-	-	-					

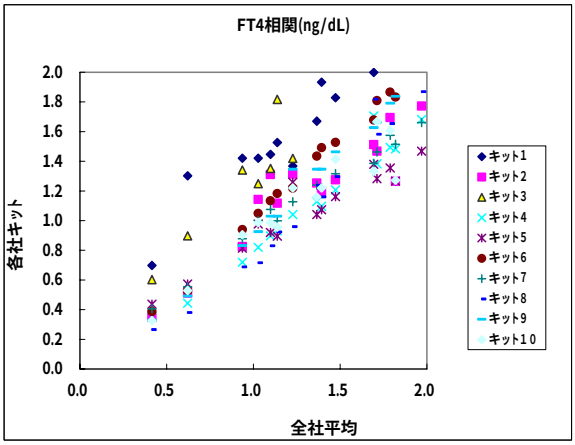
実検体	連番	ID		平均	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
プール血清	15	A	-	0.41	0.70	0.35	0.60	0.35	0.44	0.39	0.41	0.26	0.33	0.33	0.41	0.13	32%	0.70	0.26
	16	B	-	0.62	1.30	0.51	0.90	0.44	0.57	0.53	0.55	0.38	0.49	0.53	0.62	0.28	44%	1.30	0.38
	17	C	-	0.94	1.42	0.83	1.34	0.72	0.81	0.94	0.88	0.69	0.83	0.91	0.94	0.25	26%	1.42	0.69
	18	D	-	1.14	1.53	1.12	1.82	0.93	0.90	1.18	1.00	0.92	1.03	0.96	1.14	0.30	27%	1.82	0.90
	19	E	-	1.39	1.93	1.19	2.20	1.10	1.07	1.49	1.22	1.16	1.35	1.22	1.39	0.38	27%	2.20	1.07
	20	F	-	1.37	1.67	1.25	2.15	1.13	1.04	1.44	1.24	1.24	1.35	1.16	1.37	0.33	24%	2.15	1.04
	21	G	-	1.47	1.83	1.27	2.25	1.21	1.16	1.53	1.32	1.30	1.46	1.41	1.47	0.33	23%	2.25	1.16
	22	H	-	1.71	2.04	1.47	2.77	1.38	1.28	1.81	1.46	1.58	1.66	1.67	1.71	0.43	25%	2.77	1.28
	23	I	-	1.79	2.20	1.70	2.65	1.49	1.36	1.87	1.57	1.65	1.79	1.61	1.79	0.38	21%	2.65	1.36
	24	J	-	1.97	2.24	1.77	2.84	1.68	1.47	2.06	1.66	1.87	2.04	2.07	1.97	0.38	20%	2.84	1.47
	25	K	-	2.10	2.62	1.87	2.99	1.79	1.49	2.21	1.81	2.03	2.18	1.97	2.10	0.43	21%	2.99	1.49
	26	L	-	3.42	3.70	3.11	5.34	3.17	2.32	3.74	2.84	3.41	3.49	3.10	3.42	0.79	23%	5.34	2.32
	27	M	-	3.79	3.71	3.38	5.95	3.56	2.57	4.16	3.55	3.73	3.94	3.38	3.79	0.87	23%	5.95	2.57
	28	N	-	4.71	4.83	4.76	6.74	4.48	3.22	5.09	4.16	4.37	5.14	4.33	4.71	0.90	19%	6.74	3.22
	29	O	-	5.84	5.64	5.82	8.40	5.23	3.98	6.36	5.40	5.00	6.78	5.80	5.84	1.18	20%	8.40	3.98
	30	P	-																
シングルドナー血清	31	SD-1	-	1.23	1.37	1.31	1.42	1.04	1.26	1.22	1.13	0.96	1.35	1.22	1.23	0.15	12%	1.42	0.96
	32	SD-2	-	1.03	1.42	1.14	1.25	0.82	0.98	1.05	1.00	0.72	0.92	0.99	1.03	0.20	20%	1.42	0.72
	33	SD-3	-	1.69	2.00	1.51	2.50	1.70	1.38	1.68	1.39	1.82	1.63	1.33	1.69	0.35	21%	2.50	1.33
	34	SD-4	-	1.82	2.05	1.27	3.57	1.48	1.27	1.83	1.51	2.10	1.84	1.27	1.82	0.69	38%	3.57	1.27
	35	SD-5	-	1.10	1.45	1.31	1.35	0.90	0.92	1.13	1.08	0.83	1.03	0.99	1.10	0.21	19%	1.45	0.83
																CV平均	24%		

●実検体の相関性まとめ（標準品候補3による較正後）
回帰式は最大と最小のキットのみ表示
y切片＝0として回帰

（全濃度域）



（低濃度～正常域）



資料 11

【3】-1：プール血清による較正-----全濃度域のデータから補正係数を算出

候補：プール血清（全濃度域のデータから補正係数を算出）
較正方法：プール血清（全濃度域）の全キットの平均値との相関（y切片＝0）の傾きから補正係数を算出し、各キットの測定値を補正した。

較正によって実検体のCV平均は較正前の22%から13%に低下し、キット間の収束性が向上した。特に高濃度域で効果が顕著であった。

回帰式の傾きは、0.997～1.005となり、キット間差は見かけ上、1%未満となった。
ただし、低濃度～正常濃度での収束性は不十分であり、また、各検体の個体差の影響も無視できない。

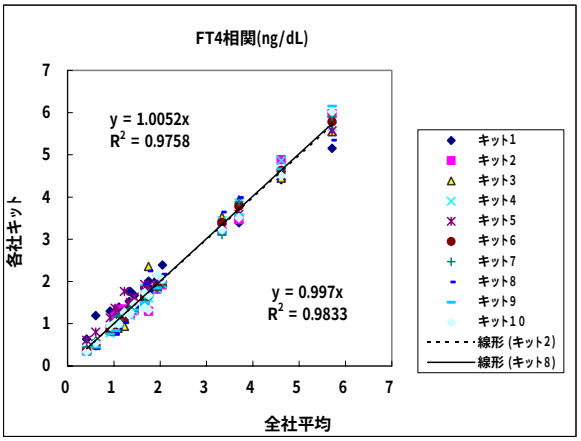
【プール血清（全濃度域）による較正後】

	連番	ID	理論濃度	補正係数	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
			ng/dL		1.202	1.278	0.751	1.202	1.130	0.896	0.942	0.765	1.062	1.056					
			ng/dL		ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL					
候補（1）（HECTEF）	1	AS1-1	1.66		1.32	1.12	0.78	0.96	1.47	0.97	1.13	0.72	1.15	1.18	1.08	0.23	21%	1.47	0.72
	2	AS1-2	4.52		2.92	3.07	1.93	2.74	3.58	2.61	2.83	2.11	3.35	3.16	2.83	0.52	18%	3.58	1.93
	3	AS1-3	7.62		3.97	5.04	3.08	4.63	5.38	3.98	4.57	3.17	5.48	4.93	4.42	0.85	19%	5.48	3.08
	4	C1-1	-		0.94	0.58	0.47	0.54	1.02	0.56	0.68	0.59	0.53	0.67	0.66	0.18	28%	1.02	0.47
	5	C1-2	-		3.10	2.06	2.85	2.67	2.79	2.69	2.37	3.75	2.90	2.48	2.77	0.45	16%	3.75	2.06
	6	PS1	-		3.92	5.07	3.45	4.76	5.09	4.29	4.56	3.81		4.61	4.39	0.57	13%	5.09	3.45
候補（2）（A社）	7	Cal-1	0.736		0.72	0.56	0.44	0.65	0.81	0.46	0.67	0.64	0.64	0.63	0.62	0.11	18%	0.81	0.44
	8	Cal-2	3.35		3.36	3.75	2.20	2.85	3.68	3.01	3.07	3.40	3.82	3.59	3.27	0.50	15%	3.82	2.20
候補（3）（B社）	9	Cal-1	0		-	-	0.00	-	-	0.00	0.06	0.06	-	-	-	-	-	-	-
	10	Cal-2	0.431		0.58	0.53	0.48	0.50	0.99	0.38	0.66	0.68	0.38	0.49	0.57	0.18	32%	0.99	0.38
	11	Cal-3	1.04		1.17	1.08	0.93	1.13	1.76	0.94	1.25	1.48	0.87	1.13	1.18	0.27	23%	1.76	0.87
	12	Cal-4	1.99		1.98	2.07	1.74	1.96	2.94	1.77	2.15	2.65	1.73	2.07	2.11	0.40	19%	2.94	1.73
	13	Cal-5	4.3		3.74	4.38	3.36	4.75	5.79	3.83	4.66	4.08	3.95	4.45	4.30	0.68	16%	5.79	3.36
	14	Cal-6	9.52		-	-	5.81	-	-	8.70	-	-	-	-	-	-	-	-	-

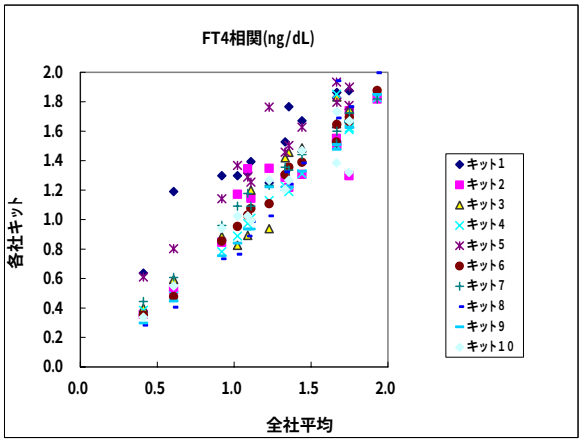
実検体	連番	ID		平均	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
プール血清	15	A	-	0.41	0.64	0.36	0.40	0.38	0.61	0.35	0.44	0.28	0.30	0.34	0.41	0.12	30%	0.64	0.28
	16	B	-	0.61	1.19	0.52	0.59	0.48	0.80	0.48	0.61	0.41	0.45	0.55	0.61	0.23	38%	1.19	0.41
	17	C	-	0.92	1.30	0.85	0.89	0.78	1.14	0.85	0.96	0.73	0.75	0.94	0.92	0.18	19%	1.30	0.73
	18	D	-	1.11	1.39	1.15	1.20	1.01	1.25	1.08	1.09	0.99	0.93	0.99	1.11	0.14	13%	1.39	0.93
	19	E	-	1.36	1.77	1.22	1.46	1.19	1.50	1.36	1.34	1.24	1.22	1.27	1.36	0.18	13%	1.77	1.19
	20	F	-	1.33	1.53	1.29	1.42	1.23	1.46	1.31	1.36	1.32	1.22	1.20	1.33	0.11	8%	1.53	1.20
	21	G	-	1.44	1.67	1.31	1.49	1.31	1.63	1.39	1.44	1.38	1.33	1.47	1.44	0.13	9%	1.67	1.31
	22	H	-	1.67	1.86	1.51	1.83	1.50	1.80	1.65	1.60	1.69	1.51	1.73	1.67	0.14	8%	1.86	1.50
	23	I	-	1.75	2.01	1.74	1.75	1.62	1.90	1.70	1.72	1.77	1.63	1.67	1.75	0.12	7%	2.01	1.62
	24	J	-	1.93	2.04	1.82	1.88	1.83	2.06	1.88	1.82	2.00	1.85	2.15	1.93	0.12	6%	2.15	1.82
	25	K	-	2.05	2.39	1.92	1.97	1.95	2.09	2.01	1.98	2.17	1.98	2.05	2.05	0.14	7%	2.39	1.92
	26	L	-	3.33	3.38	3.19	3.53	3.44	3.25	3.40	3.11	3.64	3.17	3.22	3.33	0.17	5%	3.64	3.11
	27	M	-	3.70	3.39	3.46	3.93	3.87	3.59	3.78	3.89	3.98	3.58	3.51	3.70	0.22	6%	3.98	3.39
	28	N	-	4.61	4.41	4.89	4.45	4.87	4.51	4.63	4.55	4.67	4.66	4.50	4.61	0.16	4%	4.89	4.41
	29	O	-	5.71	5.15	5.97	5.55	5.67	5.57	5.78	5.90	5.35	6.15	6.02	5.71	0.31	6%	6.15	5.15
	30	P	-												-	-	-	-	-
シングルドナー血清	31	SD-1	-	1.23	1.25	1.35	0.94	1.13	1.76	1.11	1.23	1.02	1.22	1.27	1.23	0.22	18%	1.76	0.94
	32	SD-2	-	1.02	1.30	1.17	0.83	0.89	1.37	0.95	1.09	0.76	0.84	1.02	1.02	0.21	20%	1.37	0.76
	33	SD-3	-	1.67	1.83	1.55	1.65	1.85	1.93	1.53	1.52	1.94	1.48	1.38	1.67	0.21	12%	1.94	1.38
	34	SD-4	-	1.75	1.87	1.30	2.36	1.61	1.77	1.67	1.66	2.25	1.67	1.32	1.75	0.34	20%	2.36	1.30
	35	SD-5	-	1.09	1.32	1.34	0.89	0.97	1.29	1.03	1.18	0.89	0.93	1.02	1.09	0.18	17%	1.34	0.89
																CV平均	13%		

●実検体の相関性まとめ（プール血清（全濃度域）による較正後）
回帰式は最大と最小のキットのみ表示
y切片＝0として回帰

（全濃度域）



（低濃度～正常域）



資料 12

[3]-2:プール血清による較正-----正常域のデータから補正係数を算出

候補:プール血清(正常域のデータから補正係数を算出)
較正方法:プール血清のうち、正常濃度域の3検体(ID:F,G,H)での相関(y切片＝0)の傾きから補正係数を算出し、
各キットの測定値を補正した。

較正によって実検体のCV平均は較正前の22%から11%に低下し、これまでの検討の中では最もCV値が改善した。
特に正常濃度域での効果が高かった。
ただし、シングルドナー血清(1.0～1.8ng/dL)のCV値は12～17%にと留まっており、同等濃度のプール血清の
CV値(2～8%)に比べて、効果が少なかった。
プール血清では個体差が平均化されているのに対して、シングルドナー血清では、個体差の影響を受けている可能性が考えられる。

回帰式の傾きは、0.87～1.09となり、キット間差は最大22%となった。
正常濃度域の収束性を重視した補正方法にしたために、較正の効果に偏りが生じ、高濃度域の差が広がったものと考えられた。
全濃度域を一定の係数で補正することの限界が示唆された。

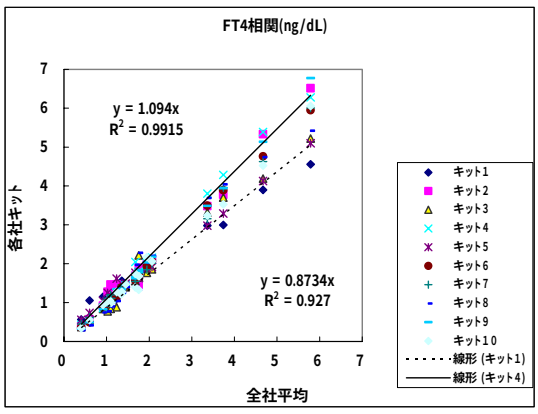
[プール血清(正常域)による較正後]

	連番	ID	理論濃度	補正係数	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
			ng/dL		1.062	1.395	0.706	1.330	1.035	0.922	0.958	0.776	1.170	1.063					
					ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL	ng/dL					
候補(1)(HECTEF)	1	AS1-1	1.66		1.17	1.22	0.73	1.06	1.34	0.99	1.15	0.73	1.26	1.19	1.09	0.21	19%	1.34	0.73
	2	AS1-2	4.52		2.58	3.35	1.81	3.03	3.28	2.68	2.88	2.14	3.69	3.18	2.86	0.57	20%	3.69	1.81
	3	AS1-3	7.62		3.50	5.50	2.90	5.12	4.92	4.09	4.65	3.22	6.04	4.96	4.49	1.03	23%	6.04	2.90
	4	C1-1	-		0.83	0.63	0.44	0.60	0.93	0.57	0.69	0.60	0.58	0.67	0.65	0.14	21%	0.93	0.44
	5	C1-2	-		2.74	2.25	2.68	2.95	2.56	2.76	2.41	3.81	3.19	2.50	2.79	0.45	16%	3.81	2.25
	6	PS1	-		3.46	5.53	3.24	5.27	4.66	4.41	4.64	3.86		4.63	4.41	0.77	17%	5.53	3.24
候補(2)(A社)	7	Cal-1	0.736		0.64	0.61	0.41	0.72	0.74	0.47	0.68	0.65	0.70	0.64	0.63	0.11	17%	0.74	0.41
	8	Cal-2	3.35		2.97	4.10	2.07	3.15	3.37	3.09	3.12	3.44	4.21	3.61	3.31	0.61	18%	4.21	2.07
候補(3)(B社)	9	Cal-1	0		-	-	0.00	-	-	0.00	0.06	0.06	-	-	-	-	-	-	-
	10	Cal-2	0.431		0.52	0.58	0.45	0.56	0.91	0.39	0.67	0.69	0.42	0.49	0.57	0.16	27%	0.91	0.39
	11	Cal-3	1.04		1.03	1.18	0.88	1.25	1.61	0.97	1.27	1.50	0.96	1.14	1.18	0.24	20%	1.61	0.88
	12	Cal-4	1.99		1.75	2.26	1.64	2.17	2.69	1.82	2.18	2.68	1.91	2.08	2.12	0.36	17%	2.69	1.64
	13	Cal-5	4.3		3.31	4.78	3.16	5.25	5.30	3.94	4.74	4.14	4.35	4.47	4.35	0.73	17%	5.30	3.16
	14	Cal-6	9.52		-	-	5.47	-	-	8.95	-	-	-	-	-	-	-	-	-

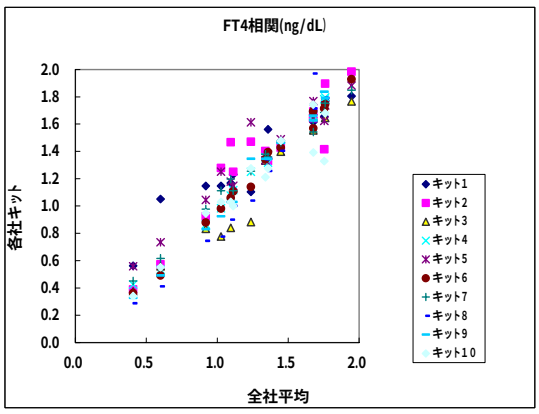
実検体	連番	ID		平均	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10	平均	SD	CV%	最大値	最小値
プール血清	15	A	-	0.41	0.56	0.39	0.37	0.43	0.56	0.36	0.45	0.29	0.33	0.34	0.41	0.09	23%	0.56	0.29
	16	B	-	0.60	1.05	0.57	0.56	0.53	0.73	0.49	0.62	0.41	0.49	0.55	0.60	0.18	30%	1.05	0.41
	17	C	-	0.92	1.15	0.92	0.83	0.86	1.04	0.88	0.98	0.74	0.83	0.95	0.92	0.12	13%	1.15	0.74
	18	D	-	1.11	1.23	1.25	1.13	1.12	1.15	1.11	1.11	1.00	1.03	1.00	1.11	0.09	8%	1.25	1.00
	19	E	-	1.36	1.56	1.33	1.37	1.32	1.38	1.39	1.36	1.26	1.35	1.28	1.36	0.08	6%	1.56	1.26
	20	F	-	1.34	1.35	1.40	1.33	1.36	1.33	1.34	1.38	1.34	1.35	1.21	1.34	0.05	4%	1.40	1.21
	21	G	-	1.45	1.48	1.43	1.40	1.45	1.49	1.43	1.47	1.40	1.46	1.48	1.45	0.03	2%	1.49	1.40
	22	H	-	1.68	1.65	1.64	1.72	1.66	1.64	1.69	1.63	1.71	1.66	1.74	1.68	0.04	2%	1.74	1.63
	23	I	-	1.76	1.77	1.90	1.65	1.80	1.74	1.75	1.75	1.79	1.79	1.68	1.76	0.07	4%	1.90	1.65
	24	J	-	1.95	1.81	1.98	1.77	2.02	1.88	1.93	1.85	2.02	2.04	2.17	1.95	0.12	6%	2.17	1.77
	25	K	-	2.07	2.11	2.09	1.86	2.16	1.91	2.07	2.01	2.20	2.18	2.06	2.07	0.11	5%	2.20	1.86
	26	L	-	3.36	2.98	3.48	3.32	3.80	2.98	3.50	3.16	3.69	3.49	3.24	3.36	0.28	8%	3.80	2.98
	27	M	-	3.74	2.99	3.78	3.70	4.28	3.29	3.89	3.96	4.04	3.94	3.53	3.74	0.38	10%	4.28	2.99
	28	N	-	4.67	3.90	5.33	4.19	5.39	4.13	4.76	4.63	4.74	5.14	4.53	4.67	0.51	11%	5.39	3.90
	29	O	-	5.79	4.56	6.52	5.22	6.28	5.10	5.94	6.01	5.42	6.77	6.06	5.79	0.69	12%	6.77	4.56
	30	P	-												-	-	-	-	-
シングルドナー血清	31	SD-1	-	1.24	1.10	1.47	0.88	1.25	1.61	1.14	1.26	1.04	1.35	1.28	1.24	0.21	17%	1.61	0.88
	32	SD-2	-	1.03	1.15	1.28	0.78	0.98	1.25	0.98	1.11	0.78	0.92	1.03	1.03	0.18	17%	1.28	0.78
	33	SD-3	-	1.68	1.61	1.69	1.55	2.05	1.77	1.57	1.54	1.97	1.63	1.39	1.68	0.20	12%	2.05	1.39
	34	SD-4	-	1.75	1.66	1.42	2.22	1.78	1.62	1.71	1.69	2.28	1.84	1.33	1.75	0.30	17%	2.28	1.33
	35	SD-5	-	1.09	1.17	1.47	0.84	1.08	1.18	1.06	1.20	0.90	1.03	1.03	1.09	0.17	16%	1.47	0.84
																CV平均	11%		

●実検体の相関性まとめ(プール血清(正常域)による較正後)
回帰式は最大と最小のキットのみ表示
y切片＝0として回帰

(全濃度域)



(低濃度～正常域)



【4】-1：平衡透析-ID-LC/MS法と各キットの相関性-----相関係数を基準としたキット選択の試み

ED-ID-LC/MSによる測定は、作業の煩雑性、測定コストの制限、等の理由によって、以下の3種の限られたサンプルでのみ実施した。
なお、グラフ中には通常の回帰式を上段、y切片=0とした回帰式を下段に示した。

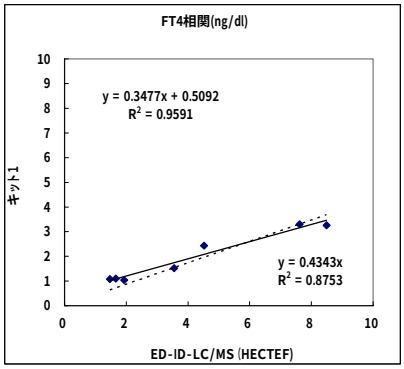
①HECTEF-AS1（血清標準物質候補品：新鮮プール血清にT4を添加、AS1-1はベースのため未添加）
②HECTEF-PS1（新鮮プール血清）
③Single検体（シングルドナー血清）
※プール血清の測定も計画していたが、検体量の不足により実施できなかった。

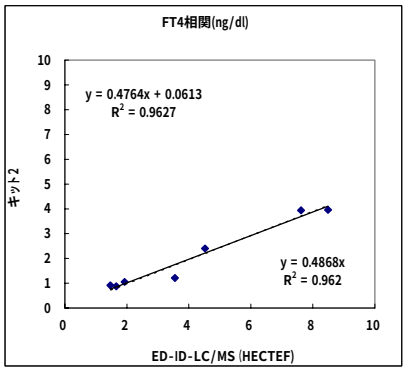
回帰式（y切片=0)の傾きは0.434～0.638となり、ED-ID-LC/MSによる測定値に対して、各キットの測定値は低値となった。
ED-ID-LC/MSの妥当性については、ReCCSおよびIFCCグループで検証実験が進められている段階であり、評価はできない状況にあるため、現時点では参考値として取り扱う必要がある。

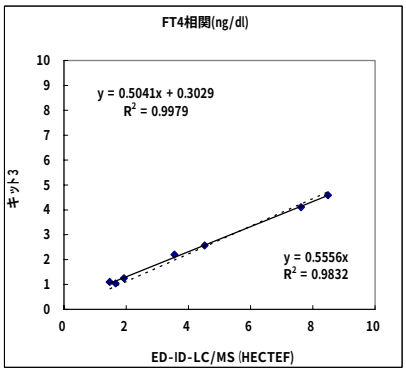
平衡透析法の値を伝達できるキットを選択する方法として、相関係数を選択基準とする方法を試みた。
相関係数（r）が0.990以上のキットを選択した場合、以下の4キットが該当した。
なお、データ数が少ないため、追加検討が必要を思われる。

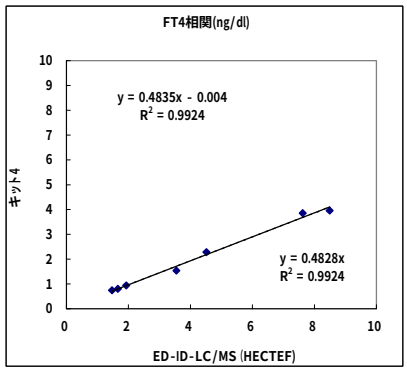
●相関係数の一覧（通常の相関）

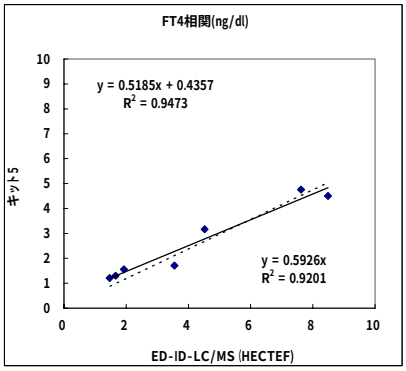
サンプル	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10
r2	0.9591	0.9627	0.9979	0.9924	0.9473	0.9835	0.9657	0.9831	0.9460	0.9338
r	0.9793	0.9812	0.9989	0.9962	0.9733	0.9917	0.9827	0.9915	0.9726	0.9663
r≧0.990	×	×	○	○	×	○	×	○	×	×

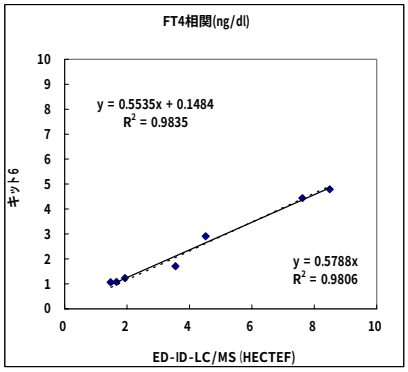




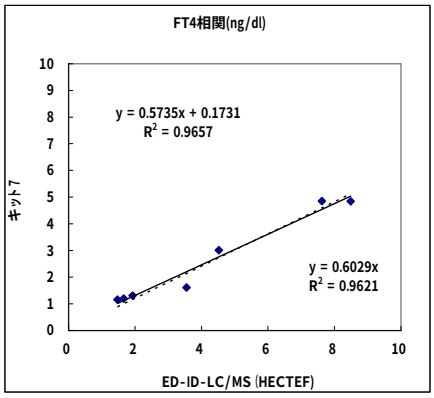


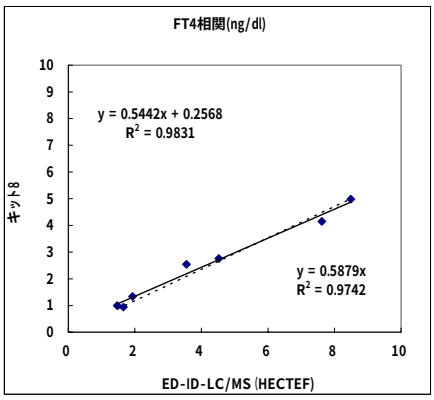


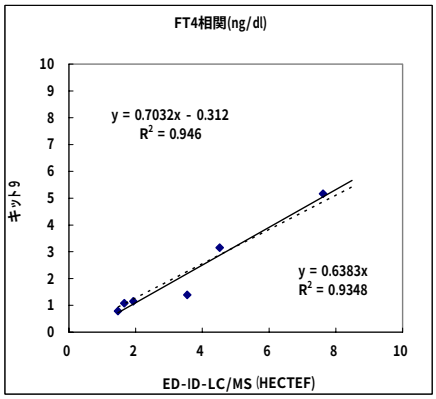


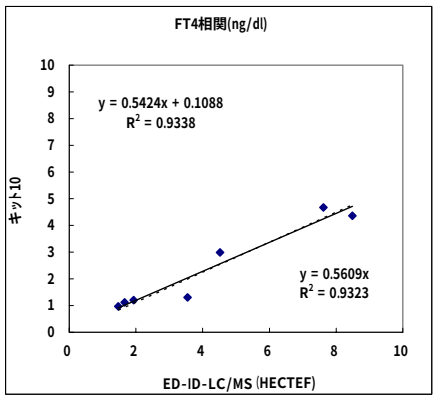


資料 13-2

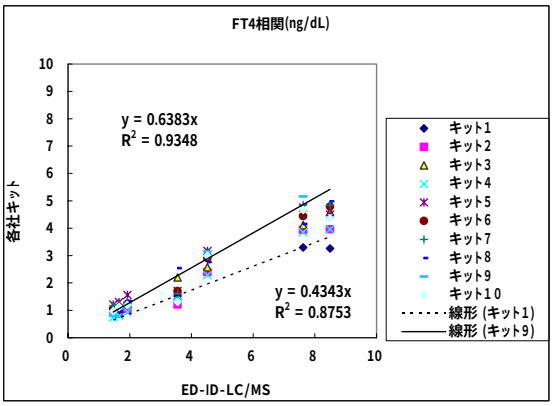








●平衡透析-ID-LC/MS法と各キットの相関性（まとめ）
回帰式は最大と最小のキットのみ表示
y切片＝0として回帰



【4】-2：平衡透析法（ED-ID-LC/MS）と各キットの相関性

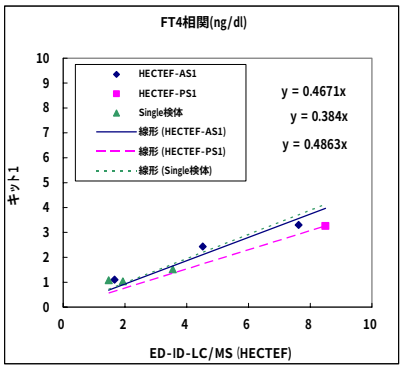
平衡透析法による測定は、作業の煩雑性、測定コストの制限、等の理由によって、以下の3種の限られたサンプルでのみ実施した。グラフには、それぞれのサンプル別の回帰式を記載した。（y切片=0として回帰）
①上段＝HECTEF-AS1（実試料標準物質候補品：新鮮プール血清にT4を添加、AS1-1はベースのため未添加）
②中段＝HECTEF-PS1（プール血清）
③下段＝Single検体（シングルドナー血清）

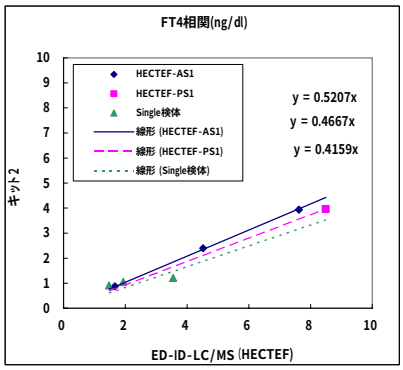
以下のグラフに示したように、ED-ID-LC/MS法との比較した場合、プール血清、シングルドナー血清、T4添加血清などの、サンプルの種類による差が比較的大きいキットと小さいキットがみられた。

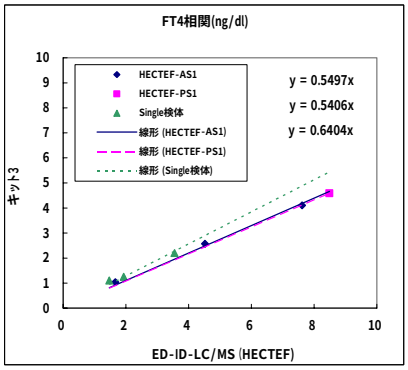
平衡透析法の値を伝達できるキットを選択する方法として、回帰式の傾きのサンプル種別間のバラツキを選択基準とする方法を試みた。
サンプル種別の傾きのＣＶ値が10%以下のキットを選択した場合、以下の５キットが該当した。
なお、データ数が少ないため、追加検討が必要を思われる。

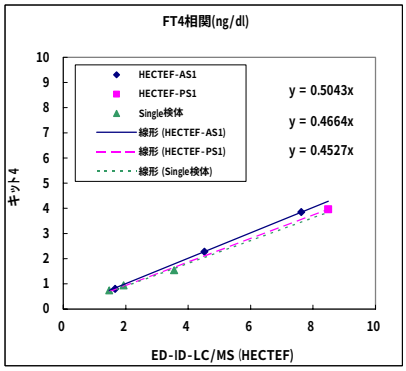
●傾きの一覧

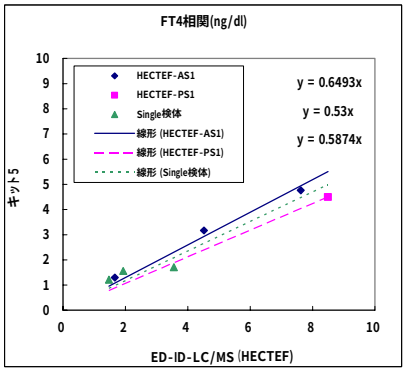
サンプル	キット1	キット2	キット3	キット4	キット5	キット6	キット7	キット8	キット9	キット10
①	0.4671	0.5207	0.5497	0.5043	0.6493	0.6004	0.6468	0.5619	0.6812	0.6272
②	0.3840	0.4667	0.5406	0.4664	0.5300	0.5642	0.5701	0.5866		0.5135
③	0.4863	0.4159	0.6404	0.4527	0.5874	0.5408	0.5381	0.7071	0.4498	0.4539
平均	0.4458	0.4678	0.5769	0.4745	0.5889	0.5685	0.5850	0.6185	0.5655	0.5315
SD	0.0544	0.0524	0.0552	0.0267	0.0597	0.0300	0.0559	0.0777	0.1636	0.0880
CV	12%	11%	10%	6%	10%	5%	10%	13%	29%	17%
CV≦10%	×	×	○	○	○	○	○	×	×	×

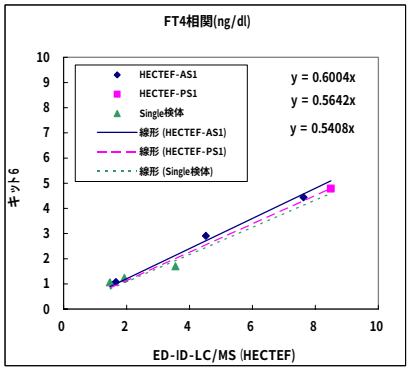




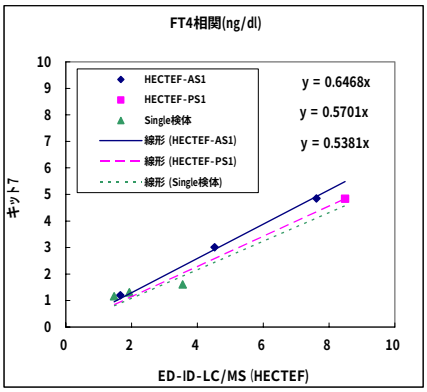


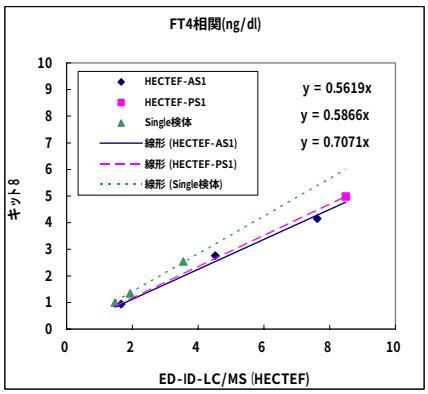


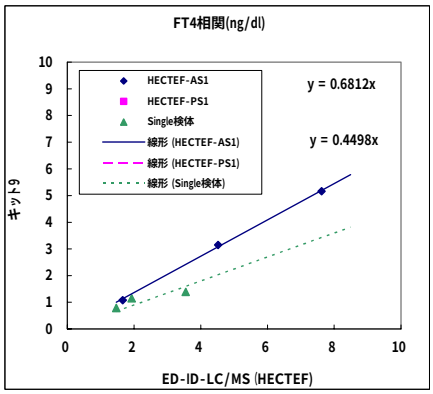


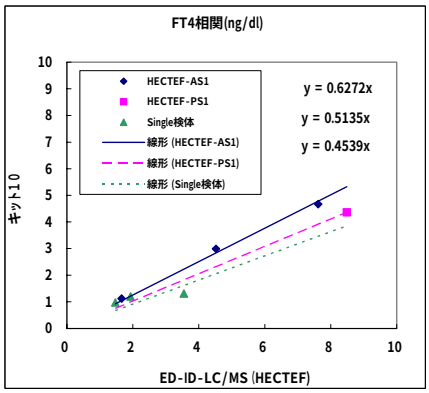


資料 14-2


FT4相関(ng/dl)
HECTEF-AS1
HECTEF-PS1
Single検体
線形 (HECTEF-AS1)
線形 (HECTEF-PS1)
線形 (Single検体)
y = 0.6468x
y = 0.5701x
y = 0.5381x
キット7
ED-ID-LC/MS (HECTEF)


FT4相関(ng/dl)
HECTEF-AS1
HECTEF-PS1
Single検体
線形 (HECTEF-AS1)
線形 (HECTEF-PS1)
線形 (Single検体)
y = 0.5619x
y = 0.5866x
y = 0.7071x
キット8
ED-ID-LC/MS (HECTEF)


FT4相関(ng/dl)
HECTEF-AS1
HECTEF-PS1
Single検体
線形 (HECTEF-AS1)
線形 (HECTEF-PS1)
線形 (Single検体)
y = 0.6812x
y = 0.4498x
キット9
ED-ID-LC/MS (HECTEF)


FT4相関(ng/dl)
HECTEF-AS1
HECTEF-PS1
Single検体
線形 (HECTEF-AS1)
線形 (HECTEF-PS1)
線形 (Single検体)
y = 0.6272x
y = 0.5135x
y = 0.4539x
キット10
ED-ID-LC/MS (HECTEF)

2-4-2-7　β2-マイクログロブリン

要旨

1）β２マイクログロブリン（以下β２m）は非特異的炎症、腫瘍マーカーとして①CRP、赤沈などで検出できない生体内の異常を大まかに知る、②B 細胞腫瘍増殖性疾患（特に骨髄腫）や AIDS などの疾患活動性や予後の推定、③腎機能特に腎糸球体濾過能の評価などに用いられる [1]。

2) 平成18年度の調査研究では測定値の互換性の現状を文献調査およびキャリブレータの値付けに関するアンケートを各社に実施し、標準化実施のための実行計画を立案した。本研究はこれを基に推奨できる標準品の選定を行い、血清検体と各社測定試薬を用いて測定値間差の現状を把握し、標準化の可能性を検証した。(ただし、尿検体に関しては、安定性の確保が困難なため今回の計画には入れていない。)

3）検体の測定値のキット間差は CV %で 11.1 %だった。天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品を調整しこれで校正した場合、CV%は 7.1 へ収束した。この標品を WHO トレーサブルなキットで値付けし校正した場合でも測定値は収束した。

1．目的

基準となる標準品およびベースを共通化して推奨できる標準品の選定を行っていくと共に、血清検体と各社測定試薬キットを用いて測定値間差の現状を把握し、標準化の可能性を検証することを目的とした。

2．委員会の構成

本ワーキンググループの構成メンバーを以下に示す。ワーキンググループ発足以降に担当者の入れ替わりなどが発生したため、企業名・担当者名は平成 19 年度報告書作成時のメンバーとした。

	氏名	所属
項目責任者	阪崎　伸一郎	栄研化学株式会社
運営管理者	小林　隆	栄研化学株式会社
柱 1／C9 担当	小林　隆	栄研化学株式会社
技術アドバイザー	家入 蒼生夫	独協医科大学
技術アドバイザー	伊藤　喜久	旭川医科大学
技術アドバイザー	桑　克彦	筑波大学大学院
技術アドバイザー	森下　芳孝	名古屋大学病院
技術担当者	飯田　邦晴	アボットジャパン株式会社
技術担当者	小谷 至彦	アルフレッサ ファーマ株式会社
技術担当者	藤本 栄樹	株式会社エイアンドティー
技術担当者	小林　隆	栄研化学株式会社

	氏名	所属
技術担当者	阪崎　伸一郎	栄研化学株式会社
技術担当者	大西　純	株式会社エスアールエル
技術担当者	保田　徹	オーソ・クリニカル・ダイアグノスティックス株式会社
技術担当者	御子柴　浩	オリンパス株式会社
技術担当者	柏田　政義	極東製薬工業株式会社
技術担当者	島名　春幸	協和メデックス
技術担当者	誉田 大仁	三洋化成工業
技術担当者	角田 浩一	シスメックス株式会社
技術担当者	工藤　隆	株式会社シマ研究所
技術担当者	斉藤 憲祐	デイドベーリング株式会社
技術担当者	前田 英征	株式会社テイエフビー
技術担当者(*1)	杉山　学	デンカ生研株式会社
技術担当者	牧　浩司	東ソー株式会社
技術担当者	伊藤　禎司	㈱苫小牧臨床検査センター
技術担当者	藤井　淳一	日本ビオメリュー
技術担当者	村上　弘	富士レビオ株式会社
技術担当者	大沢　琢雄	バイエルメディカル株式会社
技術担当者	西村　和子	ベックマン・コールター株式会社
技術担当者	野村　昭夫	株式会社三菱化学ヤトロン
技術担当者	菊池 孝志	ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
事務局	藤橋 和夫	日本臨床検査標準協議会

＊１：実験計画書作成を担当。

３．委員会の開催

43 第一回会合：2007/06/13（水）13：00～15：00　（臨薬協会議室）

44 第二回会合：2007/07/24（火）13：00～14：00　（臨薬協会議室）

45 第三回会合：2007/12/06（木）13：00～14：00　（臨薬協会議室）

46 第四回会合：2008/03/05（金）13：30～15：00　（臨薬協会議室）

４．調査研究の概要

４－１測定値の互換性の現状

本研究に参加したメーカーと試薬キット数は 14 社 17 キットだった。（報告は 13 社 16 キット。）平成 18 年度に実施した調査権研究の結果では、相関データ間のつながりから追った集計により血清検体で 19 キット中 7 キットの相対的位置関係は最大 24 %の傾きの誤差が推測された。しかし、相関係数は対照品に対して 0.95 以上と良好だった。これらの結果から傾きの補正による標準化の可能性が窺えた。[2)]

４－２市販キットのトレーサビリティの現状

平成 18 年度の企業アンケートでは下記の通りだった。[2)]

‘05/11 実施アンケート「Std 値付けについて」の結果　(回答数：12 社)

使用物質名	**WHO 標準** **5 社**	**その他(*)** **5 社**
方　法	**各社基準測定法** **5 社**	**その他(*)** **5 社**

(*)その他：現在試薬開発中であるため回答できず

参加企業14 社中 5 社の試薬において国際標品に基づいた値付けを行っている事が示された。

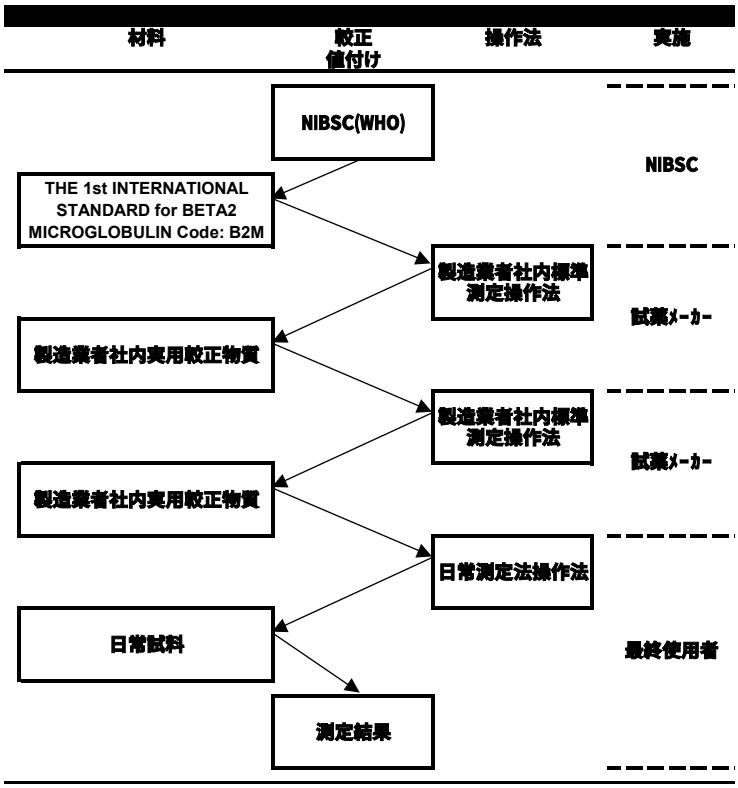


図１．トレーサビリティ連鎖図

4－3キット差の要因について

キット差を生じる要因として測定原理に起因するもの、トレーサビリティに起因するもの、試料に対する反応性およびマトリクスの影響に起因するものなどが考えられる。本項目についてはトレーサビリティに起因するものが大きな要因として考えられる。本項目の上位標準物質にはWHO標準（The 1st International Standard for BETA2 MICROGLOBULIN Code: B2M, NIBSC）が存在する。しかし、使用濃度が0.14 mg/Lと低いため血清検体に試用する試薬キットには適用し難く誤差を生じやすい現状にある。また、試料に対する反応性および検体マトリクスの影響についてもこれまでに広く検討された報告はない。[2)]

4－4標準化に向けた実行計画

4－4－1実行計画

③ 血清検体、標準物質候補品を各社β２m試薬キットで測定し、標準物質候補品による校正の効果を調査する。尿検体に関しては、安定性の確保が困難なため今回の計画には入れていない。

④ WHO標準品を同時測定し互換性を評価する。

⑤ 委員会でデータを解析し、標準化に向けた方向性を検討する。

⑥ 添付資料１に実験の詳細を示した。

4－4－2実施内容

① 血清検体はあらかじめ依頼した濃度域毎に必要量プールして協力機関から30例入手した。（表１）

② 標準物質候補品は天然抗原とリコンビナント抗原の2種を4濃度、マトリクスの影響も考慮して血清ベースと緩衝液ベースで準備した。（表１）

③ 各社固有の測定試薬およびキャリブレータを用い、各検体(30例)を各2～3重測定した。必要があれば、各社指定の検体希釈液を用いて測定した。

④ データの解析は参加企業の協力を得て行い、委員会会議において討議した。

⑤ データ解析は参加14社17キット中報告のあった13社16キットについて行った。

表１：測定試料一覧

	抗原(標品)種	ﾏﾄﾘｯｸｽ	設定濃度
1	The 1st International Standard for BMG (WHO標準)	Buffer系	0.14 mg/L
2	精製抗原(天然系)	血清・Buffer系	1, 2, 4, 8 mg/L
3	精製抗原(リコンビナント)	血清・Buffer系	1, 2, 4, 8 mg/L

4	血清検体		0 ～ 1 mg/L、5 検体
			1 ～ 10 mg/L、10 検体
			10 ～ 20 mg/L、10 検体
			20 ～ 100 mg/L、5 検体

4-4-3実施結果

① WHO 標準品、標準物質候補品表示濃度との回帰式の傾き（表２）

WHO 標準品、標準物質候補品を各試薬キットで多重測定し、その測定値と標準物質候補品の表示濃度（重量換算）との回帰式を求めその傾きを表２に示した。なお、標準物質候補品に BSA を含まない Buffer ベースを使用したとき、いずれのキットにおいても 1%BSA を含む Buffer ベースの標準物質候補品と比較して 20～50 %の報告値低下が認められたため補正値計算は省略した。Buffer ベースに BSA を含まない場合は、β２mが容器に吸着していると考えられた。（以下本報告書にある Buffer ベースとは１%BSA が添加された場合を指す。）

表２：標準物質候補品のよる校正係数の算出（校正後の全社平均に対する傾き）

キットNo.	WHO標準	天然抗原		リコンビナント抗原	
		血清ベース	Bufferベース	血清ベース	Bufferベース
1	1.64	1.01	0.96	0.85	0.93
2	0.93	1.00	1.70	0.95	0.98
3	1.43	0.99	2.00	0.96	0.98
4	0.79	0.84	0.81	0.78	0.84
5	0.79	1.00	0.94	1.02	1.07
6	1.14	0.95	0.93	0.75	0.77
7	0.93	1.07	1.03	0.89	0.91
8	*1	1.06	1.02	0.60	0.63
9	1.29	1.15	1.05	0.92	0.98
10	1.07	1.00	0.96	0.83	0.86
11	1.79	0.98	0.91	0.77	0.77
12	1.07	1.17	1.14	1.01	1.08
13	1.43	1.01	1.01	0.91	0.96
14	1.00	0.96	0.97	0.81	0.85
15	1.50	1.09	1.06	0.90	0.96
16	0.79	0.82	0.82	0.32	0.32
17					
平均値	1.17	1.01	1.08	0.83	0.87
中央値	1.07	1.00	0.99	0.87	0.92
最大値	1.79	1.17	2.00	1.02	1.08
最小値	0.79	0.82	0.81	0.32	0.32
最大値／最小値	2.27	1.42	2.48	3.17	3.39
C.V.(%)ー傾き	27.6%	9.2%	29.3%	20.8%	21.6%

*1:WHO標準測定値が測定限界以下のため算出できず。

*2:WHO標準品は1濃度のため報告値／表示濃度(0.14mg/L、重量換算)で傾きを求めた。

- WHO 標準測定：傾きは 0.79～1.79、最大約 2.3 倍の差があった。また、測定値が測定範囲以下の試薬キットもありこれを標準物質とすることは困難と思われた。
- 天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品を測定した結果は傾き 0.82～1.17、最大 1.4 倍の差で最も収束しており、16 キット中 14 キットが傾き 0.9～1.1 の範囲内だった。
- その他の標準物質候補品においては傾きに大きな差があり、これらを標準品とするのは困難と思われた。

②標準候補品による血清検体の校正効果

表３に各試薬キットによる血清検体の測定値と全社平均値の相関を求めその傾きを示した。（表中・校正前）また、表２で求めた傾きで各測定値を校正しその全社平均値との相関を求めその傾きも示した。

表３：標準物質候補品のよる校正（校正後の全社平均に対する傾き）

ｷｯﾄNo.	校正前	WHO標準	天然抗原		リコンビナント抗原	
			血清ﾍﾞｰｽ	Bufferﾍﾞｰｽ	血清ﾍﾞｰｽ	Bufferﾍﾞｰｽ
1	0.98	0.67	0.98	1.06	0.91	0.86
2	0.98	1.18	0.99	0.60	0.81	0.82
3	1.00	0.78	1.01	0.52	0.82	0.83
4	0.82	1.17	0.99	1.05	0.83	0.80
5	0.85	1.21	0.86	0.93	0.66	0.65
6	1.01	0.96	1.06	1.12	1.05	1.07
7	1.06	1.28	1.00	1.07	0.94	0.95
8	1.06	*1	1.01	1.08	1.38	1.38
9	1.02	0.89	0.90	1.00	0.87	0.85
10	0.99	1.03	1.00	1.07	0.93	0.94
11	1.03	0.64	1.05	1.16	1.05	1.09
12	1.24	1.29	1.07	1.12	0.96	0.93
13	1.00	0.79	1.00	1.03	0.86	0.86
14	1.02	1.14	1.07	1.09	0.99	0.98
15	1.14	0.85	1.05	1.11	1.00	0.97
16	0.78	1.12	0.96	0.99	1.93	2.01
17						
平均値	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
中央値	1.01	1.03	1.00	1.06	0.93	0.94
最大値	1.24	1.29	1.07	1.16	1.93	2.01
最小値	0.78	0.64	0.86	0.52	0.66	0.65
最大値／最小値	1.58	2.00	1.25	2.25	2.92	3.11
C.V.(%)ー傾き	11.1%	21.8%	5.9%	18.2%	29.2%	31.5%
C.V.(%)ー全測定値	11.1%	21.4%	7.1%	19.2%	29.9%	32.2%

*1:WHO標準測定値が測定限界以下のため算出できず。

- 天然抗原系：血清ベースの標準品で校正した場合、相関性傾き=0.86～1.07、傾きのCV=5.9 %となり、キット報告値（未補正）で見たときよりもキット間差が縮小し、16キット中 15 キットが傾き 0.90～1.10 の範囲内に入った。
- 天然抗原系：血清ベース以外の標準品で補正した場合はいずれもキット報告値（未補正）で見たときよりも相関の傾きの差が拡大し、キット間 C.V.も増大した。一部のキットにおいては血清ベース／Buffer ベースの間、または天然抗原／リコンビナント抗原の間で顕著な反応性の違いが認められた。

③WHO 標準にトレーサブルな代表キットの選定とその校正効果

本研究で準備した標準物質候補品（WHO 標準品、天然抗原、リコンビナント抗原）の表示濃度は重量換算であり、日常検査法へのトレーサビリティは確認されていない。そこで、WHO 標準に対しトレーサビリティが確認されている試薬キットを代表キット（キット No.2、7、14）として選び出し、これらのキットによる血清検体平均値による校正、および代表キットによる天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品の測定平均を求めてこれを標準候補品の WHO 準拠値とし、血清検体の校正効果をシミュレーションした。シミュレーションは最も収束効果の期待できる天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品で確認した。

表４：WHO 標準品にトレーサブルな代表キットによる校正

キットNo.	代表キット平均値による校正後	WHOトレーサブルとした場合の標準候補品による校正後
1	0.94	0.96
2	0.94	0.97
3	0.96	0.99
4	0.79	0.97
5	0.81	0.84
6	0.96	1.04
7	1.01	0.98
8	1.02	0.99
9	0.98	0.88
10	0.95	0.97
11	0.98	1.03
12	1.18	1.04
13	0.96	0.98
14	0.98	1.05
15	1.09	1.03
16	0.75	0.94
17		
平均値	0.96	0.98
中央値	0.96	0.98
最大値	1.18	1.05
最小値	0.75	0.84
最大値／最小値	1.58	1.25
C.V.(%)ー傾き	11.1%	5.9%
C.V.(%)ー全測定値	11.1%	7.1%

代表３キットを基準として、その報告値平均を対照としたときの各キット（未補正）相関性は、相関性傾き=0.77～1.21、キット間 CV=11 %、相関係数=0.995～1.000 となった。

天然抗原系：血清ベースの標準品による補正値（天然抗原系：血清ベース標準品の代表３キット測定値平均を表示濃度として補正）でみた場合、代表３キットの平均を対照としたときの各キット相関性は、相関性傾き=0.84～1.05、キット間 CV=7.1 %、相関係数=0.995～1.000 となった。キット報告値（未補正）で見たときよりもキット間差が縮小した。

５．今後の課題

今回の17試薬キット（報告16キット）での共同実験によって血清検体においてキット間CV%は約11 %あることがわかった。このキット差は共通の標準物質を用意して各試薬キットの値付けを実施すればCV7 %前後まで収束する効果が期待できることが分かった。

今後の課題としては、

① 抗原（天然またはリコンビナント）およびベース血清の安定供給と品質の確保。

② 標準物質の性状の検討（液状あるいは凍結乾燥品)。

③ リコンビナント抗原を使用する場合、試薬キット間の反応性の差を埋める検討が必要。

④ 尿検体での標準物質候補品による校正効果の検討。

⑤ 標準物質の価格や使用法の検討。

⑥ 次ロットのIRMM ERM-DA470(CRM470)との整合性の検討。

６．結び

平成 18 年度の調査～平成 19 年度の共同実験研究において、β 2 m標準化の方向性の探求を行い、校正効果の高い標準物質候補品を提案するに至った。今後はこれを普及するための具体的作業を、学会、企業団体の協力の基に実行することが望まれる。

文献

1) 伊藤喜久：β 2-マイクログロブリン。日本臨床第 6 版　p.255

2)（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構　知的基盤創成・利用促進研究開発事業　平成 18 年度成果報告書 p.567）

添付資料１

2007/10/30 改訂
BMG 担当
（デンカ生研株式会社）

柱1ﾜｰｷﾝｸﾞｸﾞﾙｰﾌﾟ C9（腫瘍ﾏｰｶｰ） BMG 実行計画書

【目 次】

1. 目的と計画概要
2. 参加企業
3. 各社試薬のトレーサビリティ体系に関する調査結果
4. 検討用試薬および材料等の購入について
5. 検討用試料の準備について
6. 各社試薬での測定値間差是正について
7. 推奨できる標品の設定について
8. 実行スケジュール

1. 目的と計画概要

JCCLS 柱 1 項目群 WG により実行計画が示され、腫瘍ﾏｰｶｰ群は調査研究項目群として C9WG に分類される。β2 マイクログロブリン（BMG[またはβ2-MG]）は C9WG 調査研究対象項目（8 項目）中の一つであり、公的標品の存在有無等による JCCLS の分類においては「分類 2（基準①-B）」に属する。

本 WG（BMG）では「分類 2（基準①-B）」に基づいた実行計画を立案した。概要としては、基準となる標準品およびベースを共通化して推奨できる標準品の選定を行っていくと共に、実検体と各社測定試薬を用いて測定値間差の現状を把握し、是正の可能性を検証する。

尿検体に関しては、安定性の確保が困難なため今回の計画には入れていない。

2. 参加企業

アボット ジャパン株式会社	株式会社エーアンドティー
栄研化学株式会社	極東製薬
協和メデックス	三洋化成工業株式会社
シスメックス株式会社	デイドベーリング
デンカ生研株式会社	東ソー株式会社
苫小牧臨床	日本ビオメリュー株式会社
富士レビオ株式会社	株式会社三菱化学ヤトロン

以上 14 社 17 試薬 （2007 年 10 月現在）

3. 各社試薬のﾄﾚｰｻﾋﾞﾘﾃｨ体系に関する調査結果

BMG には WHO 推奨国際標品が存在し、NIBSC より「The 1st International Standard for BETA2 MICROGLOBLIN Code B2M」として発売されている。この国際標品と各社試薬の「Std値付け」との関係についてアンケート調査を行ったところ、次の通りの回答が得られた。

‘05/11 実施ｱﾝｹｰﾄ「Std 値付けについて」の結果 (回答数：12 社)

使用物質名	WHO 3 社	NIBSC 2 社	その他(*) 5 社
方　法	各社基準測定法 5 社		その他(*) 5 社

(*)その他：現在試薬開発中であるため回答できず

参加企業14 社中 5 社の試薬において国際標品に基づいた値付けを行っている事が示された。

4. 検討用試薬および材料等の購入について

一連の計画を実行するために必要な試薬等の概要は以下の通りである。

品　名	使 用 目 的
各社測定試薬等	検討試料を測定するために使用する。
公的標準品	検討結果と公的標準品との関係を明確にするために使用する。
血清検体	測定値ｷｯﾄ間差の検証に使用する。
抗　原	「推奨できる国内標準品」の検討に使用する。
血　清	血清系ﾏﾄﾘｯｸｽの調製に使用する。
緩衝液成分	Buffer 系ﾏﾄﾘｯｸｽの調製に使用する。
保存容器	検討試料の保管に使用する。

個々の詳細情報については次の通りである。

4－1 各社測定試薬等

検討に必要な各社測定試薬を約 300 テストと見積もった。ただし、本テスト数は検体や標品の入手状況や、得られた検討結果に応じて変動する可能性がある。具体的な製品一覧については（別項参照）のこと。

4－2 公的標準品

公的標準品として WHO 推奨国際標品が存在するため、検討に使用する公的標準品として以下の標品を選定した。

品名	The 1st International Standard for BETA2 MICROGLOBLIN Code B2M (WHO 推奨品)
ﾒｰｶｰ	NIBSC
code	B2M
由来	Human serum
容量	100 IU/vial (140 ng/mL)
数量	2 本

4－3 血清検体

各社測定試薬の共通測定ﾚﾝｼﾞ(1～20 mg/L)を元に、検証が必要とされる濃度域を設定した。(一部ｷｯﾄは測定範囲を超えるが、必要に応じてｷｯﾄ指定希釈液で希釈測定) 各社測定試薬で2重測定を行う際に必要な量を 600uL とした。

設定濃度域	検体数	検体量
0～1 mg/L	5	1検体 13.2 mL (0.6 mL x 22 本)
1～10 mg/L	10	
10～20 mg/L	10	
20～100 mg/L	5	
(合　計)	30	

＊検体収集の際の注意事項:血清検体を使用する。

4－4 抗原

参加企業に対するアンケート結果を基に、国内標準品候補の抗原として以下の抗原を選定した。

品名	BMG 精製抗原	BMG 精製抗原
ﾒｰｶｰ	C-C ﾊﾞｲｵﾃｸ社	ｵﾘｴﾝﾀﾙ酵母
由来	ﾋﾄ	ﾘｺﾝﾋﾞﾅﾝﾄ
容量	1 mg, 100 mg	1 mL、5 mL
数量	2 mg	

4－5 血清

ｵﾘｴﾝﾀﾙ酵母工業(株)にて作成した BMG ﾌﾘｰ血清を血清系ﾏﾄﾘｯｸｽのベースとして使用す

る。

4－6 緩衝液成分

参加企業に対するアンケート結果を基に、Buffer 系マトリックスとして 1%BSA 含有 50mMTris-HCl 緩衝液 (pH7.5) を選定した。作成に必要な成分は以下の通りとなる。但し、アンケートの中で、BSA による吸着が懸念されるとの意見があったので、BSA 含有のものと、BSA を含まないもの 2 種類を用意する。

品名	Tris(緩衝剤)	BSA
メーカー	Sigma	Sigma
code	T1503	A7030
容量	100g	10g
数量	1	4

＊安定化剤･添加剤に関する注意事項 ： 作製した検討用試料は、比較検討に用いる前に凍結融解で影響を受けないこと/安定性等に問題がないことを確認する。

4－7 保存容器

品名	(チューブ)	(保管用セラムボックス)
メーカー	アシスト	住友ベークライト
code	72.694MPC	MS-99160
数量	1,000	100 本/箱で 60 箱

5. 検討用試料の準備について

作製する検討用試料一覧

	抗原 (標品) 種	マトリックス	設定濃度 (mg/L)
1	The 1st International Standard for BMG	Buffer系	0.14
2	精製抗原	血清系	1、2、4、8
3	精製抗原	Buffer系(2 種)	1、2、4、8

調製方法

検討用試料は重量希釈法で正確に作製し、原液濃度とのトレーサビリティがとれるようにする。公的標準品(WHO 標準)はもともとの濃度が低いため原液のものしか用意できず、キットによっては測定

精度の維持が困難な可能性がある。

保存･配布方法

検討用試料 ： 1回に使用する分として、1 mL ずつ小分けして凍結し、配布する。

検体 ： 測定試薬1種類で測定する分として、0.6 mL ずつ小分けして凍結し、配布する。

6. 各社試薬での測定値間差是正について

検証方法

各社固有の測定試薬およびキャリブレータを用い、血清検体（30例）を各 2 重測定する。必要があれば、各社固有の検体希釈液を用いた測定を行っても良い。得られた測定結果は、WG 共通フォーマットにてデータまとめ担当者へ送付する。

結果の評価方法

各試薬の測定値の全平均を求めて、各社試薬との相関関係を確認する。指標には回帰式および相関係数を用いる。乖離値の有無についても確認し、各社試薬での測定値間差是正について考察する。

7. 推奨できる標品の設定について

検証方法

各社固有の測定試薬およびキャリブレータを用い、5. 項で作製した試料 9 例を各 3 重測定する。得られた測定結果は、WG フォーマットにてデータまとめ担当者へ送付する。

結果の評価方法

マトリクス種と抗原種の組合せ毎に各社試薬の測定値を集計し、【6. 各社試薬での測定値間差是正について】と同様の手法で評価する。更に、公的標準品の測定結果、患者検体と健常人検体測定結果とを併せて考慮し、妥当性のあるマトリクスと抗原の組合せを見いだす事ができれば本 WG（BMG）の「推奨できる標品」とする。但し、キットによりマトリックスの影響差が認められた場合は、感度が高くマトリックスの影響が小さいと考えられる EIA 系のキットを用い、公的標準品により値付けされた血清ベースの二次標準を設定する必要がある。

8. 実行ステップ

step-1 ： 実行計画書完成･承認

step-2 ： 試薬および検討用原材料収集

step-3 ： 検討用試料の作製

step-4 ： 検討実験

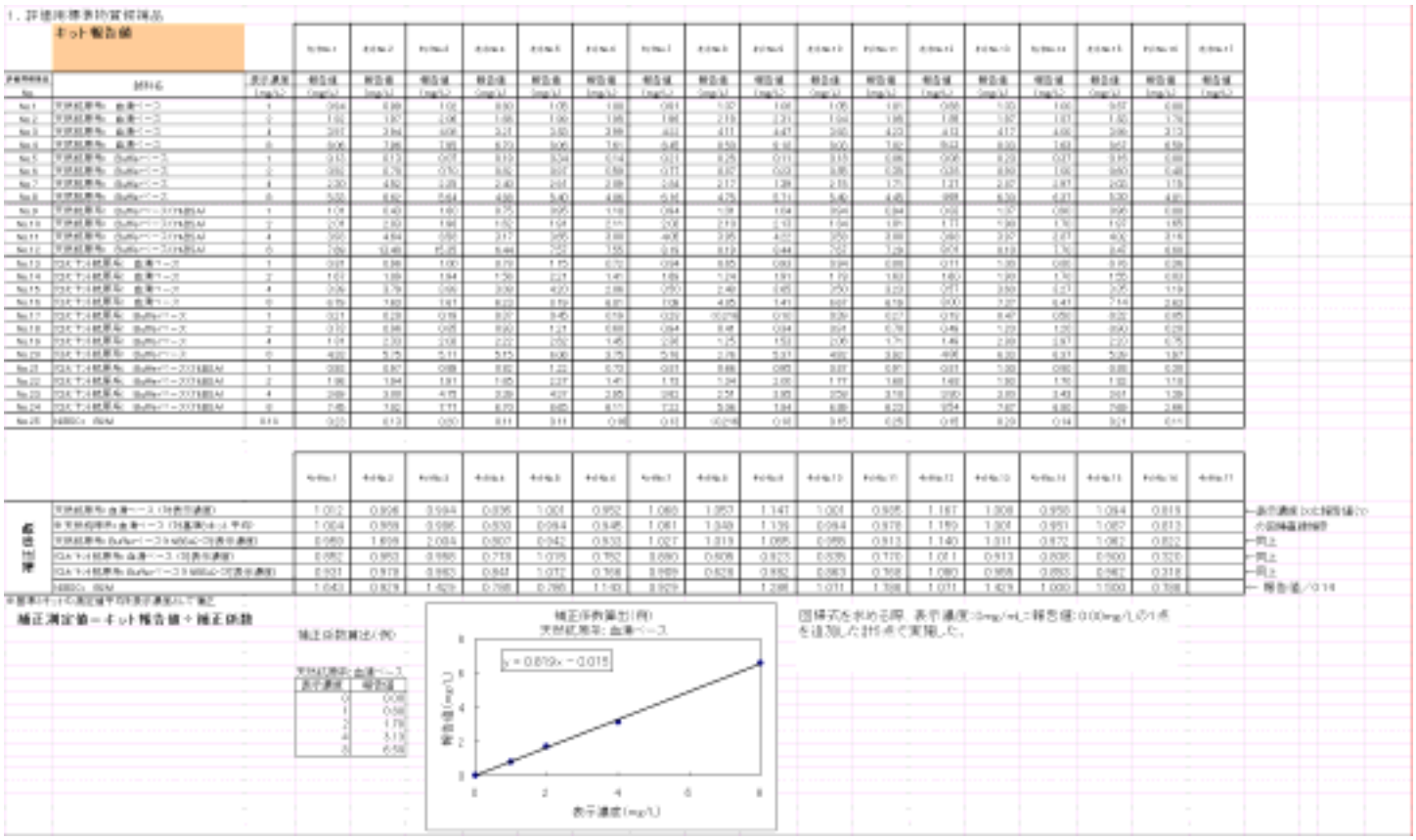
step-5 ： 結果の解析･評価

step-6 ： 最終報告

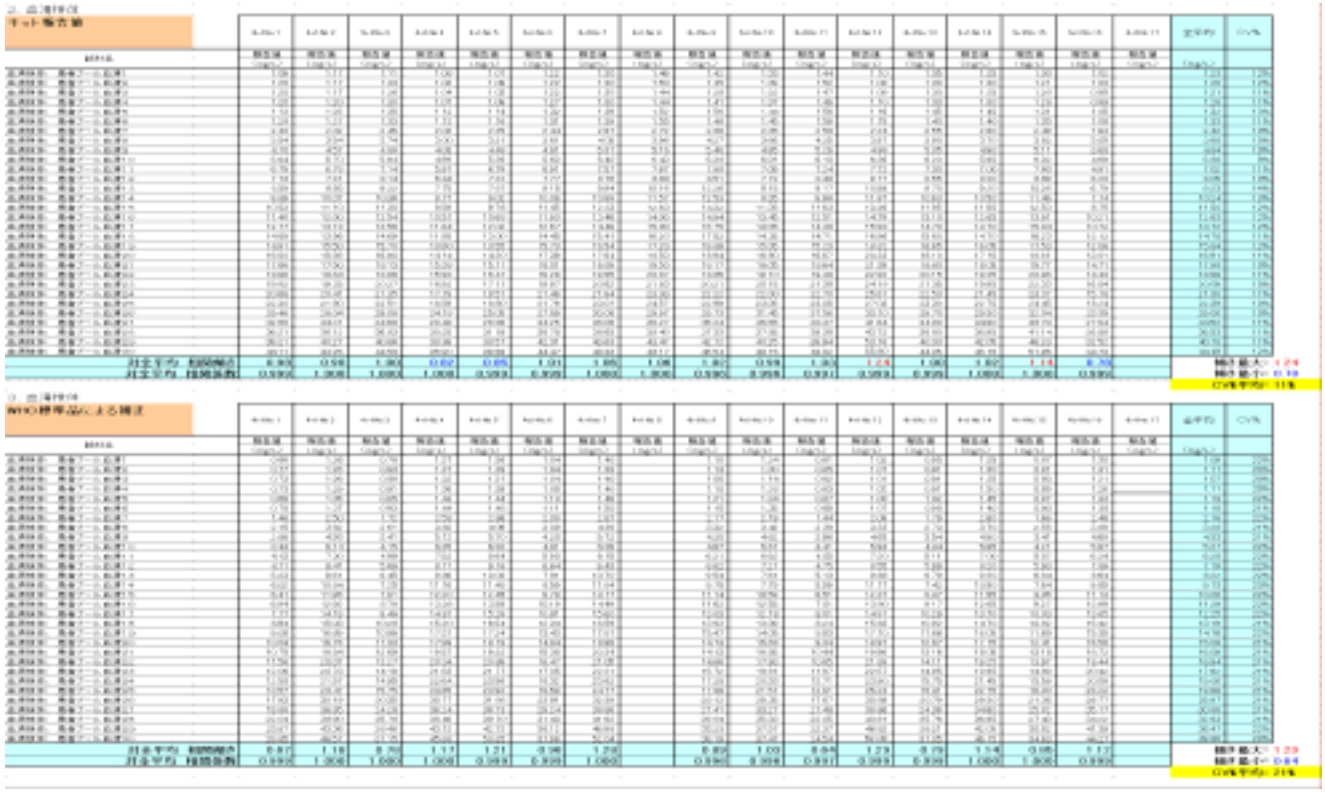
3－1 各社測定用試薬等

会社名	キット名	
	試薬	標準品
アボットジャパン	アキシム β2-マイクロ･ダイナパック	AxSYM β2-マイクロ･キャリブレータ
エイアンドティー	イムノティクルス オートβ2-m	β2-m標準(血清用)、β2-m標準(尿用)
栄研化学	LZテスト‘栄研’β2-M	WHO
	LX試薬‘栄研’β2-M-II	WHO
極東製薬	ランピア ラテックス β2-マイクログロブリン	β2-マイクログロブリン標準品
協和メデックス	ケミルミβ2-MG	校正剤β2M-S,校正剤 β2M-U
三洋化成工業	スフィアライトβ2－m	スフィアライトβ2－mキャリブレータセット
シスメックス	ランリームβ2M	β2M キャリブレータ
デイド ベーリング	N-ラテックス β2-マイクログロブリンII	
デンカ生研	BMG－ラテックス X1「生研」	BMG 標準液 X1
東ソー	E テスト「TOSOH」II (BMG) 免疫反応試薬	E テスト「TOSOH」II (BMG) 標準品セット
日本ビオメリュー	バイダスアッセイキットβ2-マイクログロブリン	β2 キャリブレータ S1
苫小牧臨床	スペリオル BMG-II	スペリオル BMG-II 標準液セット
富士レビオ	ルミパルス β2M-N	標準β2M 溶液(血清･血漿用、尿用)
	ルミパルスプレスト β2M	β2M キャリブレータ(血清･血漿用、尿用)
三菱化学ヤトロン	エルピアエースβ2m(S)II	β2m標準品
	エルピアエースβ2mII	β2m標準品

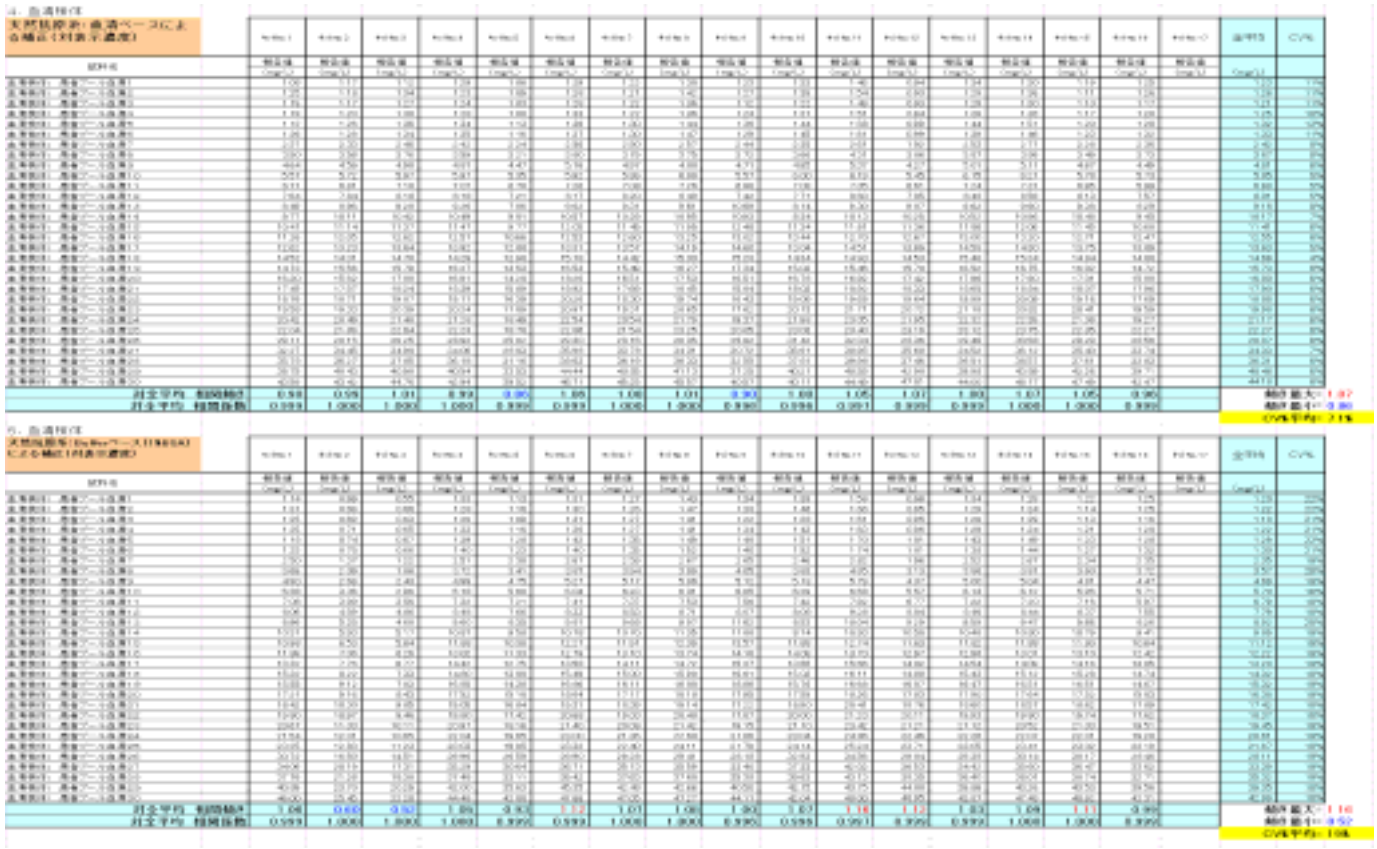
添付資料２：標準物質候補品および WHO 標準品測定結果と補正係数の算出



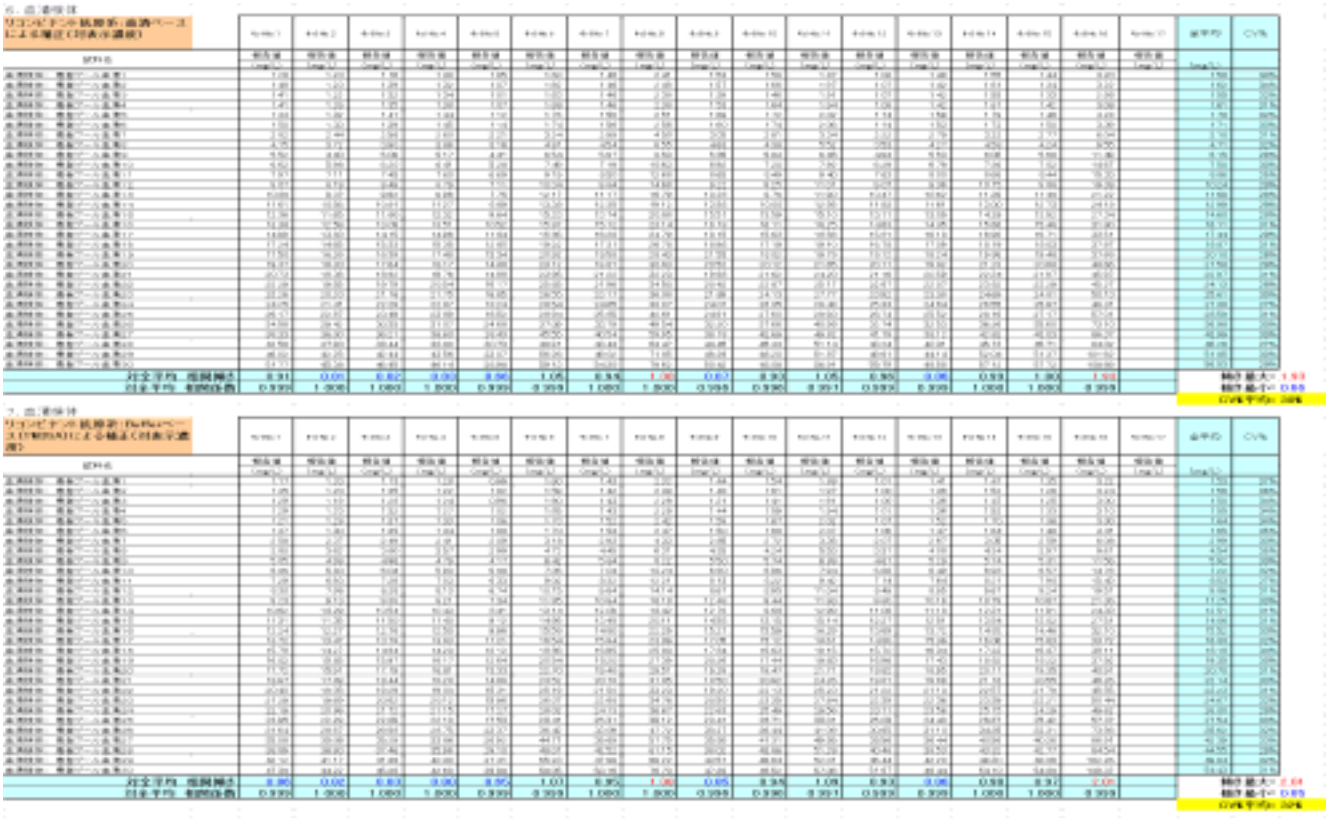
添付資料３：キット報告値と WHO 標準品による校正後の全社平均に対する相関性



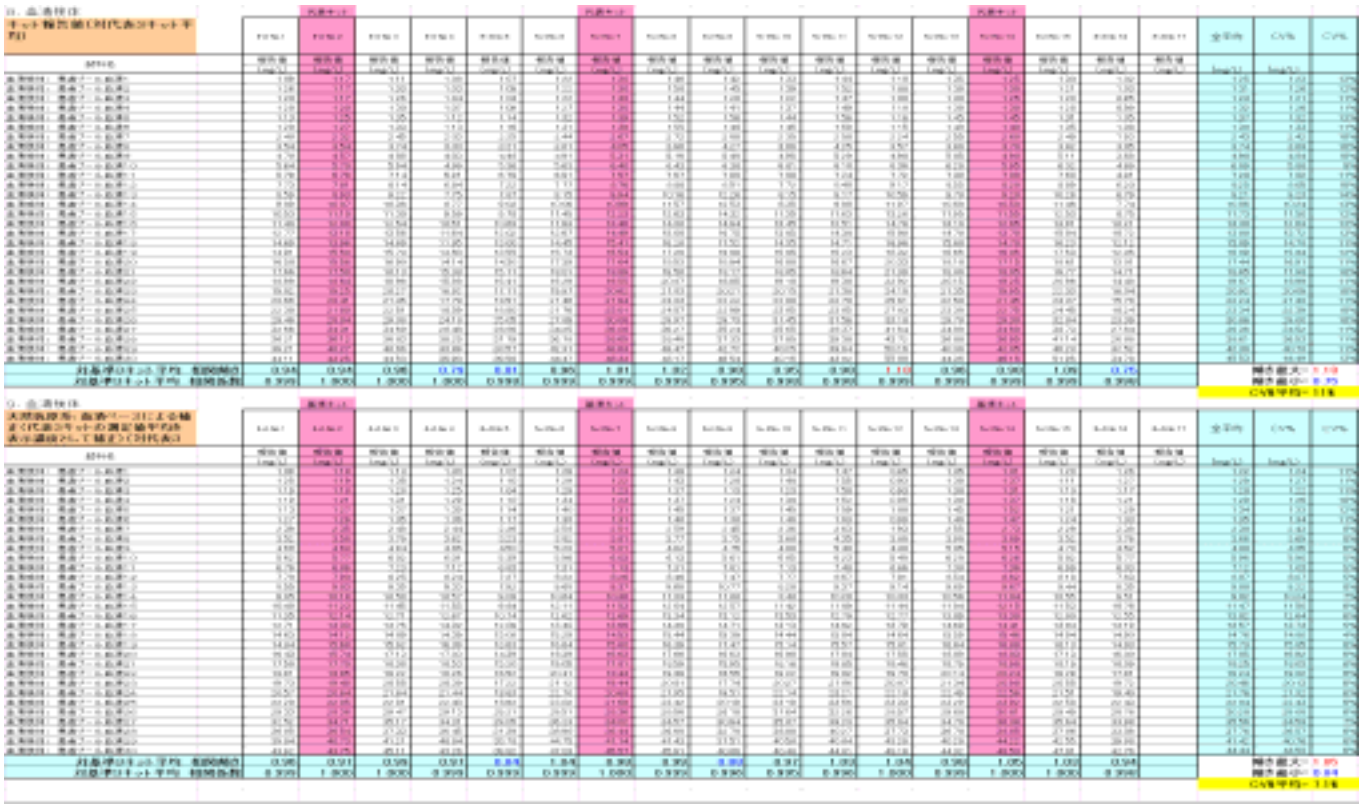
添付資料４：天然抗原系標準物質候補品による校正後の全社平均に対する相関性



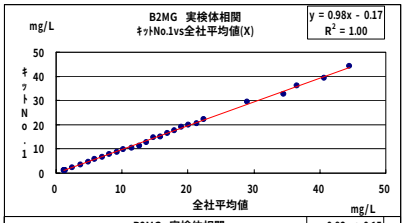
添付資料５：リコンビナント抗原系物質候補品による校正後の全社平均に対する相関性

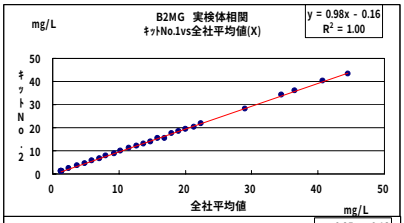


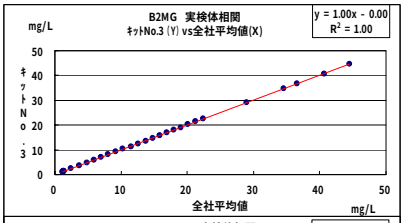
添付資料６：代表 3 キットによる臨床検体測定平均値による校正後と代表 3 キットによる天然抗原系血清ベースの標準物質候補品測定平均値による校正後

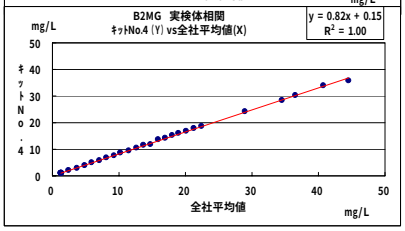


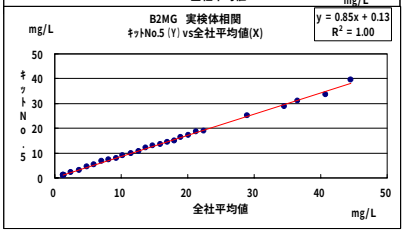
添付資料７：全社平均に対する相関性（グラフ）

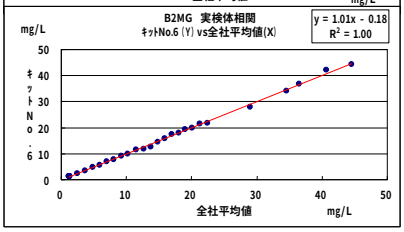


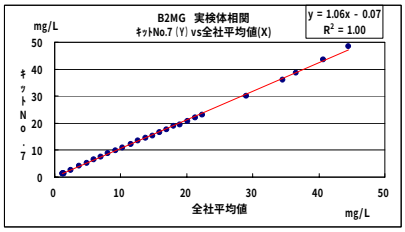


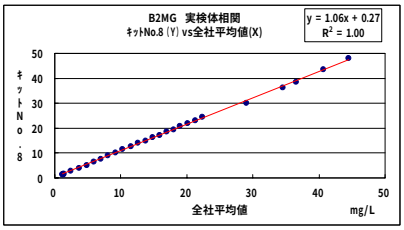


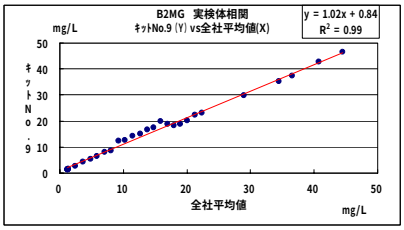


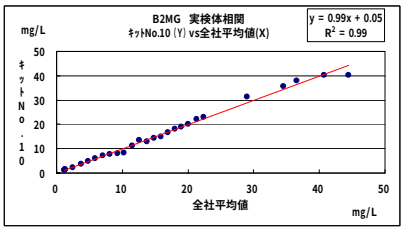


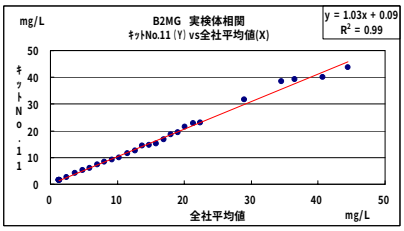


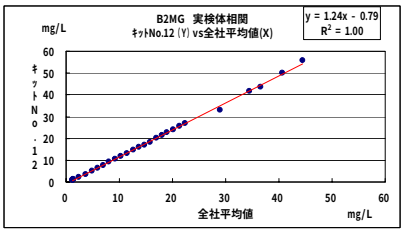


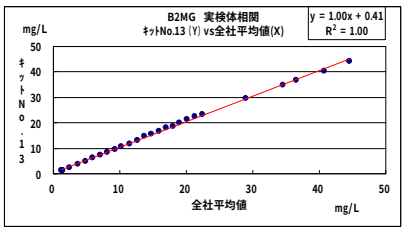


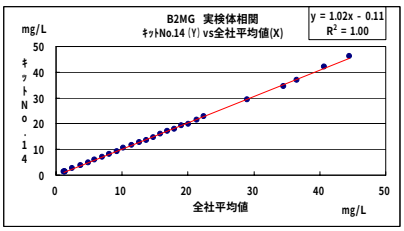


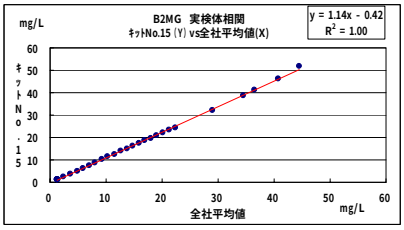


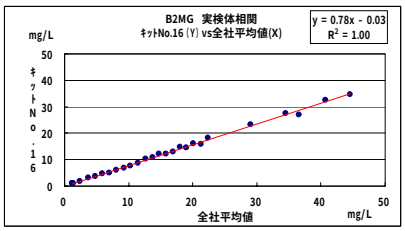


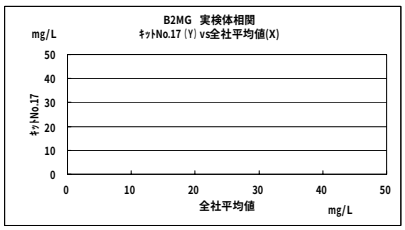




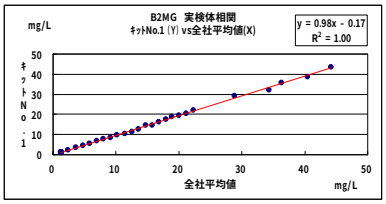


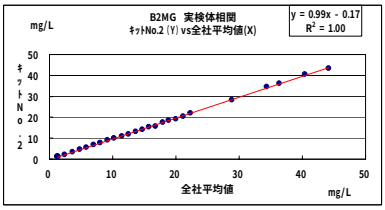


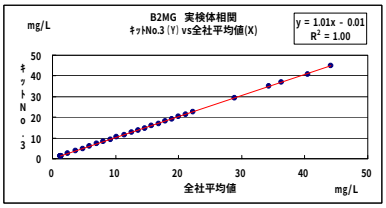


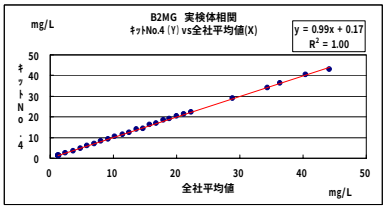


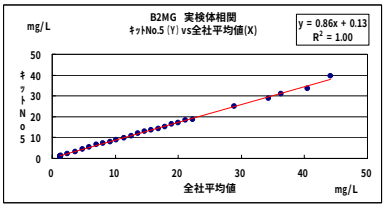
添付資料８：全社平均に対する相関性　天然抗原系：血清ベースによる補正

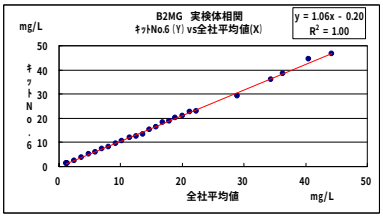


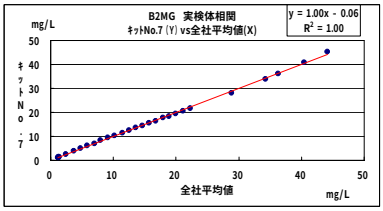


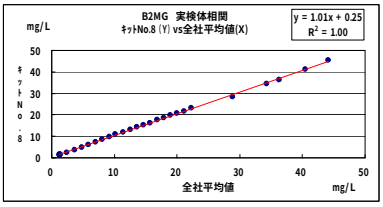


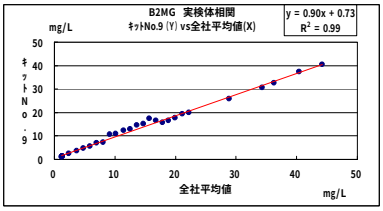


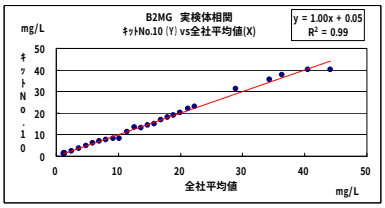


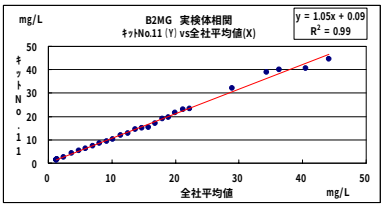


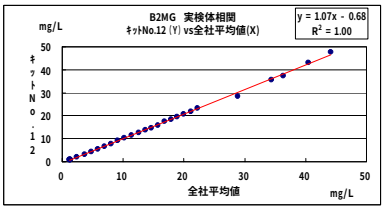


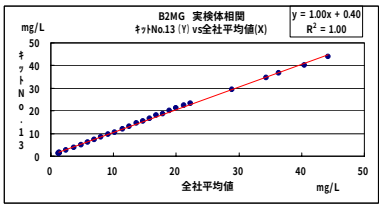


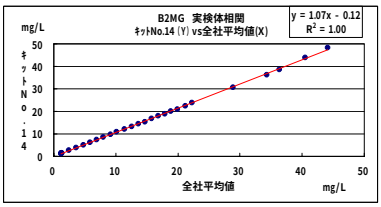


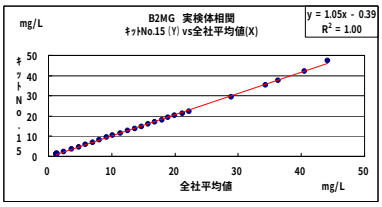


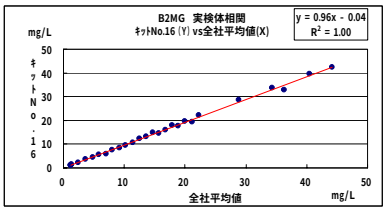


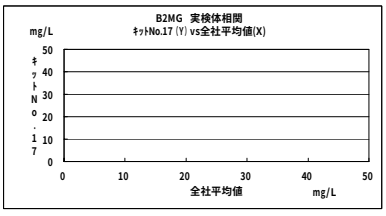




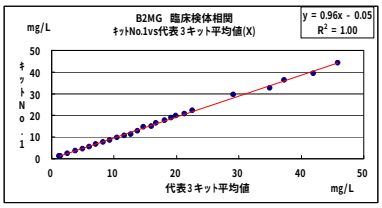


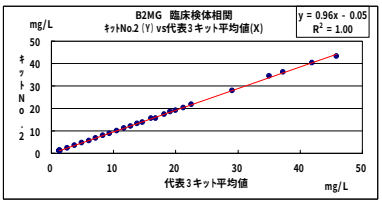


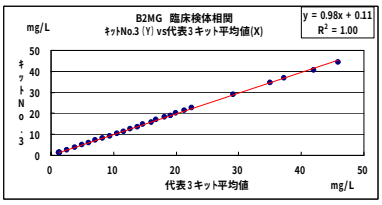




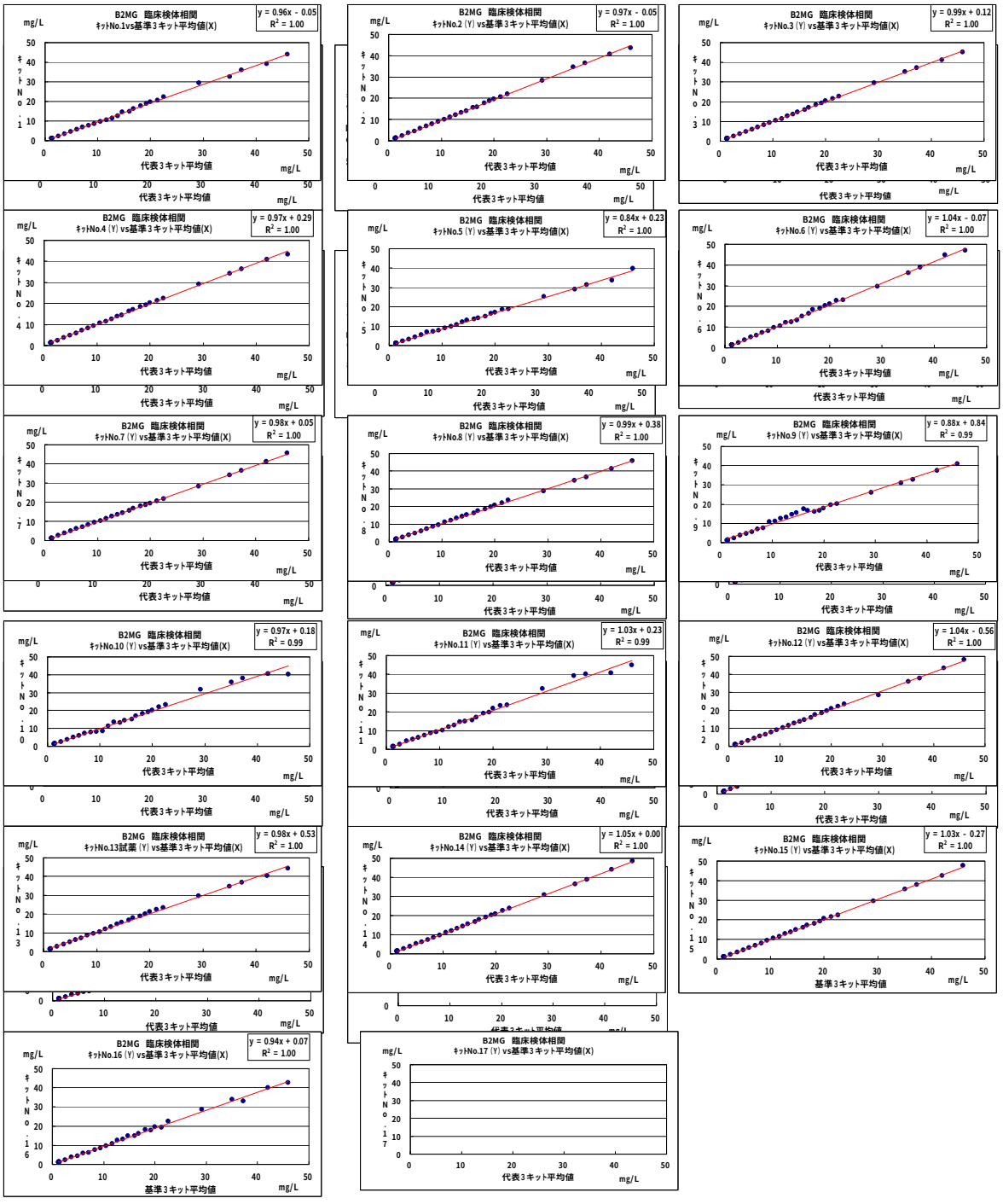
添付資料９：代表３キット平均に対する相関性（未補正）



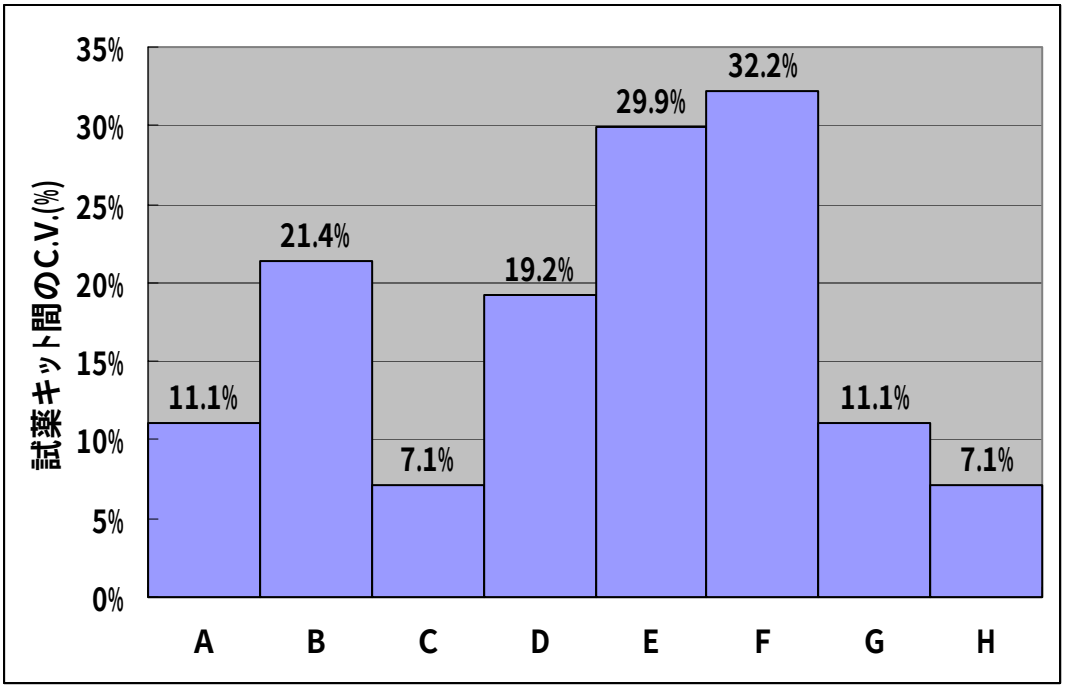




添付資料 10：基準３キット平均に対する相関性　天然抗原系：血清ベースによる補正（基準３キットの測定値平均を表示濃度として補正）



添付資料 11：図２　試薬キット間の CV %まとめ（血清検体測定値・各種標準候補品による校正後の全検体・全試薬キット平均値から算出）



A：測定値（未補正）
B：WHO 標準品による校正後
C：天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品による校正後
D：天然抗原系：Buffer ベースの標準物質候補品による校正後
E：リコンビナント抗原系：血清ベースの標準物質候補品による校正後
F：リコンビナント抗原系：Buffer ベースの標準物質候補品による校正後
G：キット報告値（WHO 標準品にトレーサブルな代表３キットによる天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品の測定平均値で校正）
H：天然抗原系：血清ベースによる校正（代表３キットの天然抗原系：血清ベースの標準物質候補品の測定値平均を表示濃度として校正）

2-4-2-8　　FDP・D ダイマー

要旨

1）FDP と D ダイマーは実試料系標準物質の調査研究項目として位置づけられ、柱 1 では標準物質に相当する人工物を作ることを目標とした。

2）既に国際血栓止血学会では D ダイマーについて、また国内でも検査血液学会や血栓止血学会（以下 学会）が Harmonization という手法にて FDP と D ダイマーの試薬間差の是正改善に向けた事業を進めている。これら学会と方向性を同じにし、さらにトレーサビリティの拠り所となる人工的な二次標準物質の設定が可能か否か模索した。

3）平成 18 年度は FDP において血清 FDP と血漿 FDP を合算してヒト由来の試料で Harmonization 可能であること、D ダイマーも同様にヒト由来の試料にて、ある程度の収束性が得られることを確認し、しかしながら FDP と D ダイマーともに二次標準物質の設定に至らなかったことを報告した。

4）平成 19 年度も二次標準物質の設定について検討を行なったが、ヒト由来の試料でのデータ収束を確認したにとどまり、二次標準物質の設定には至らなかった。

1．委員会の構成

本委員会は調査研究項目群 C8・WG で、メンバーの構成は下記のとおりである。

アドバイザー	福武　勝幸	（東京医科大学）
	桑　克彦	（筑波大学大大学院）
	森下　芳孝	（三重大学）
責任者	遠見　真理	（積水メディカル株式会社）
柱１担当	嶋本　三利	（三菱化学メディエンス）
運営管理者	飯塚　和之	（シノテスト）
委員	藤本　栄樹	（エイアンドティー）
	山岸　昇芳	（極東製薬工業）
	塚原　通男	（シスメックス）
	秋葉　千佳子	（シノテスト）
	永山　尚	（デイドベーリング）
	山田　一多	（日水製薬）
	真子　千枝	（日本ビオメリュー）
	桜井　錠冶	（三菱化学メディエンス）
	黒須　宣行	（ロシュ・ダイアグノスティック）
	及部　みゆき	（医学生物研究所）
	新谷　晃司	（東ソー）
	岩崎　満	（カイノス）

事務局　　藤橋　和夫　（日本臨床検査標準協議会）

２．委員会の開催

第１回　2007 年 10 月 24 日　（臨床検査薬協会会議室）

第２回　2008 年　3 月　5 日　（臨床検査薬協会会議室）

３．進行の手順

１）平成 18 年度の試料測定結果を踏まえ、数種類の二次標準物質の候補試料（凍結乾燥品）を作製した（三菱化学メディエンス社主動）。

２）学会が準備するヒト由来試料とともに 1)の試料を測定した。

３）ヒト由来試料について、測定値の収束性を検討し、同様の挙動を示す候補品を二次標準物質としたい。

４）今回の FDP の検討においては血清 FDP 試薬を含めず血漿 FDP 試薬のみを検討対象とし、D ダイマーとともに検討を行った。

４．ヒト由来試料（血漿）

学会から供与いただいた試料は以下の通りである。

１）FDP または D ダイマーが 5-25 μg/mL の検体を 100 本準備し、高低 10 本ずつを除き 80 検体を混合した 9 μg/mL（D ダイマー）前後の試料およびその希釈試料（健常者血漿による 4 階調希釈）、合計 5 階調の試料

２）80 検体について低値から 20 検体ごとにプールした 4 種の試料

３）高値および低値の 16 個別検体を健常者血漿で 10 倍希釈した試料、合計 16 検体分の試料

以上、合計 25 種類

５．二次標準品の候補品

三菱化学メディエンス社が主動して精製、作製した二次標準物質候補品（凍結乾燥品）

１）高分子分画の FDP・D ダイマーと低分子 FDP・D ダイマーとの混合調製品 5 種

６．測定結果

ヒト由来試料のうち、80 検体のプールおよびその希釈試料と 20 検体のプール試料合計 9 種をプール試料として位置づけ試薬間の測定値を比較し、更に個別試料 16 検体と二次標準品候補品について比較した。

-FDP について-

表 1 にプール試料の測定値を示した。9 つの試薬で測定されたそれぞれの試料の値について平均値と中央値を求め、更に CV%と RANGE を求めた。9 つの試薬全体で大きく外れた値を示したものがなかったことから、平均値を用いて試料の値を評価した。各試料測定の CV%は濃度が

低いほど大きいものの、カットオフ付近の濃度域（10 μg/mL）では 10 %前後であり、80 検体をプールした試料 1 と 20 検体をプールした試料 3 と 4 は同程度の CV%であった。全体的に僅かに 80 検体のプール試料の RANGE が 20 検体プールの RANGE より小さい傾向も見られたが、カットオフ付近のプール試料 1、プール試料 3 とプール試料 4 の RANGE は 3.0～4.2 であり、80 検体で作製されたプールと 20 検体で作製されたプールの間に大差はなかった。低濃度である希釈試料 4 と、高濃度であるプール試料 5 を比較しても、その RANGE の差は小さく、以上の結果は、試薬間におけるプール試料での収束性を確認するにあたっては、20 検体程度のプールでも可能であることを示唆した。

表1. FDP ヒト由来試料測定値-1 (プール) μg/mL

	ヒト由来試料　1) 80検体のプール					ヒト由来試料　2) 20検体のプール			
試薬	プール試料1	希釈試料1	希釈試料2	希釈試料3	希釈試料4	プール試料2	プール試料3	プール試料4	プール試料5
1	13.1	8.0	5.0	2.7	1.4	8.4	10.2	13.5	21.5
2	12.3	6.3	3.3	2.2	1.3	6.2	8.4	10.8	20.7
3	12.4	7.2	4.5	3.2	2.3	6.9	8.3	11.4	24.4
4	12.9	6.8	4.0	2.8	2.3	8.2	9.2	13.3	24.1
5	14.7	8.5	5.8	4.2	3.6	8.6	10.2	14.1	24.0
6	13.3	7.1	4.1	2.7	2.0	8.2	9.2	13.2	21.6
7	11.1	6.2	3.5	2.4	1.8	6.4	7.6	10.6	21.4
8	13.0	7.2	3.9	2.2	1.3	8.5	9.5	13.1	22.2
9	15.0	8.3	4.8	3.0	2.1	9.0	10.6	14.8	24.4
平均値	**13.1**	**7.3**	**4.3**	**2.8**	**2.0**	**7.8**	**9.2**	**12.8**	**22.7**
中央値	**13.0**	**7.2**	**4.1**	**2.7**	**2.0**	**8.2**	**9.2**	**13.2**	**22.2**
SD	1.19	0.83	0.79	0.62	0.72	1.04	1.00	1.48	1.50
CV%	9.1	11.4	18.4	22.1	36.0	13.3	10.9	11.6	6.6
min	11.1	6.2	3.3	2.2	1.3	6.2	7.6	10.6	20.7
max	15.0	8.5	5.8	4.2	3.6	9.0	10.6	14.8	24.4
RANGE(9)	**3.9**	**2.3**	**2.5**	**2.0**	**2.3**	**2.8**	**3.0**	**4.2**	**3.7**
RANGE(8)	**3.9**	**2.1**	**1.7**	**1.0**	**1.0**	**2.8**	**3.0**	**4.2**	**3.7**

図１　プール試料の測定値平均値をＸ軸、各試薬実測値をＹ軸にして作図した。

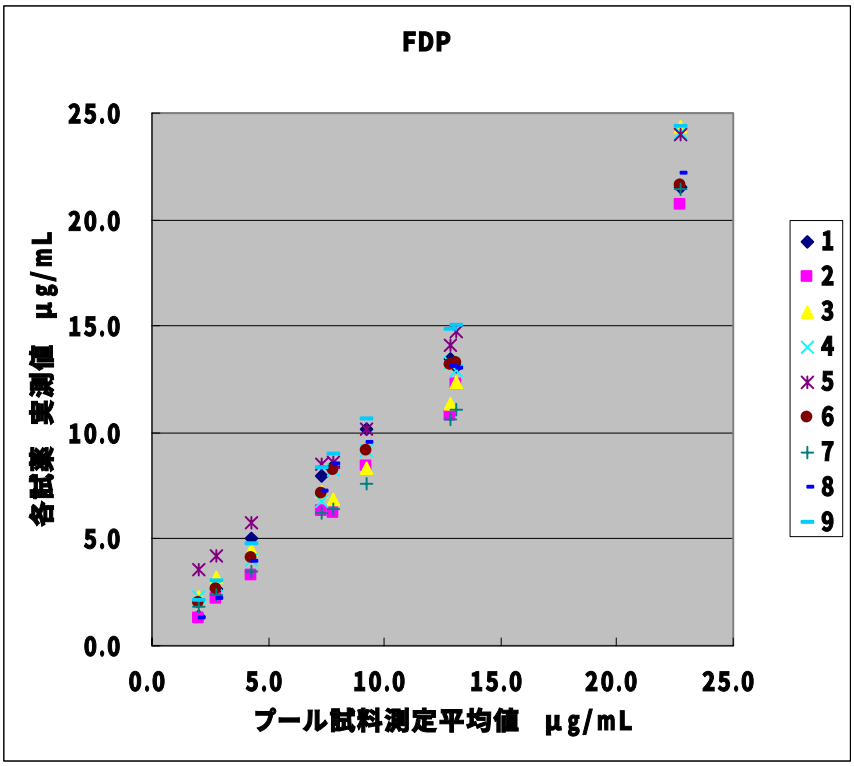


図１　プール試料による相関図

個別試料 16 検体について、9 つの試薬での測定結果を表 2 に示した。
一部の測定値を除き、多くの測定値は各試薬の基準値内に相当した。検体ごとの CV %は 20～40 %台に分布し、また RANGE は 3.0 μg/mL 前後、RANGE の平均値は 2.7 μg/mL であった。この RANGE はプール試料測定値の RANGE と同程度であった。しかし個別検体測定結果では、試薬 5 が全ての検体を高めに測定したことから、これによって全検体の RANGE が大きくなったものと思われ、この試薬 5 を除いて再度 8 試薬で RANGE を検討を試みた。ほとんどの試料の RANGE は小さくなり、その全体平均は 1.7 μg/mL と小さくなった。同様にプール試料についても 8 試薬で RANGE を検討しなおしたが、その平均値は変わらず 3.7 μg/mL であった。

以上の表 1 と 2 の結果は、個別試料では 9 つの試薬間の測定値の差が大きいものの、基準値付近では大きな差に至らず、またプール試料においては個別試料と異なり 9 つの試薬間で、ある程度の収束性が得られることを示すものであった。

表2. FDP 個別試料16検体 μg/mL

試薬	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	3.2	3.1	4.1	3.1	3.7	2.6	3.3	1.7	3.2	2.5	2.3	1.8	1.6	1.3	2.1	2.8	
2	2.4	3.3	3.7	2.3	2.7	3.1	2.4	1.4	2.3	3.5	2.1	1.6	1.3	1.2	1.8	2.0	
3	3.3	3.6	4.0	3.2	3.9	3.9	3.6	2.5	2.9	3.7	2.5	2.3	1.9	1.9	2.1	2.8	
4	2.9	3.0	3.4	2.9	3.3	3.2	2.9	2.1	2.7	2.8	2.2	3.1	1.9	2.0	2.3	2.9	
5	4.5	5.6	5.0	4.4	4.7	5.1	4.8	4.4	4.8	6.0	3.6	4.0	3.3	3.4	3.7	4.0	
6	2.9	2.9	3.1	2.9	3.1	3.2	2.8	1.9	2.7	2.8	1.9	3.0	1.6	1.7	2.0	2.8	
7	2.5	2.9	3.3	2.6	2.9	3.1	2.5	1.7	2.5	3.1	1.5	1.5	1.5	1.4	1.8	2.3	
8	2.5	2.5	2.8	2.5	2.9	2.8	2.3	1.2	2.2	2.2	1.3	2.6	0.9	1.0	1.4	2.3	
9	1.5	2.5	1.8	2.4	2.5	2.4	2.9	3.0	2.9	3.6	3.0	3.0	3.2	3.7	2.9	4.2	
平均値	2.9	3.3	3.5	2.9	3.3	3.3	3.1	2.2	2.9	3.4	2.3	2.5	1.9	2.0	2.2	2.9	
中央値	2.9	3.0	3.4	2.9	3.1	3.1	2.9	1.9	2.7	3.1	2.2	2.6	1.6	1.7	2.1	2.8	
SD	0.82	0.94	0.90	0.64	0.69	0.81	0.78	0.99	0.77	1.11	0.71	0.82	0.82	0.96	0.69	0.75	
CV%	28.3	28.5	25.7	22.1	20.9	24.5	25.2	45.0	26.6	32.6	30.9	32.8	43.2	48.0	31.4	25.9	
max	4.5	5.6	5.0	4.4	4.7	5.1	4.8	4.4	4.8	6.0	3.6	4.0	3.3	3.7	3.7	4.2	
min	1.5	2.5	1.8	2.3	2.5	2.4	2.3	1.2	2.2	2.2	1.3	1.5	0.9	1.0	1.4	2.0	平均値
RANGE(9	3.0	3.1	3.2	2.1	2.2	2.7	2.5	3.2	2.6	3.8	2.3	2.5	2.4	2.7	2.3	2.2	2.7
RANGE(8	1.8	1.1	2.3	0.9	1.4	1.5	1.3	1.8	1.0	1.5	1.7	1.6	2.3	2.7	1.5	2.2	1.7

二次標準物質候補品（凍結乾燥品）の測定値について

表 3 に二次標準物質候補品の測定値を示した。二次標準物質は凍結乾燥品で、人工的に調製された XDP の高分子分画をベースに、低分子分画を混合したものであった。その混合比は 100:0、100:1、100:2、100:4、100:10 の 5 段階であった。

混合比に応じて高値化傾向を示す試薬、混合比に依存せず一定の値を示す試薬の 2 つのパターンが観察されたが、高値化傾向を示した試薬におけるその高値化の程度は試薬によって異なった。また試料（二次標準物質候補品）測定値のレベルは、表 1 のプール試料 1～5 に相当した（10 μg/mL 前後～30 μg/mL の比較的高い値を示す試料であった）。

CV%と RANGE は、100：0 で一番小さく、混合比に依存して、また低分子分画の割合が増加するに従って、大きくなった。これら二次標準物質候補品の CV %と RANGE を、同レベルであったプール試料 1～5 と比較すると、CV %：29.1～48.8、RANGE：10.0～25.3 は非常に大きい値であり、その収束性はプール試料に及ばない結果であった。

表3. FDP 二次標準品候補物質 (凍結乾燥品) μg/mL

	凍結乾燥品				
試薬	100:0	100:1	100:2	100:4	100:10
1	15.5	16.4	18.6	21.0	29.9
2	10.0	10.5	10.2	10.1	10.4
3	12.9	13.1	13.0	13.0	12.9
4	10.6	11.9	13.5	16.4	27.2
5	8.5	8.6	8.5	8.7	8.7
6	8.6	9.6	10.8	12.6	19.0
7	10.0	9.6	9.9	9.8	10.1
8	10.2	11.4	12.4	14.6	23.5
9	18.5	19.9	24.3	21.4	34.0
平均値	11.6	12.3	13.5	14.2	19.5
中央値	10.2	11.4	12.4	13.0	19.0
SD	3.38	3.67	5.00	4.66	9.52
CV%	29.1	29.8	37.0	32.8	48.8
min	8.5	8.6	8.5	8.7	8.7
max	18.5	19.9	24.3	21.4	34.0
RANGE	**10.0**	**11.3**	**15.8**	**12.7**	**25.3**

-D ダイマーについて-

D ダイマーについても、FDP と同一の試料を測定した。昨年度の活動報告では高低によって 2 つのグループに分けて集計した。今年度は FE　unit と DD　unit の 2 つのグループに分けて集計を試みた。表 4 と 5 はプール試料を測定した結果で、表 4 は DD　unit のグループ、表 5 は FE　unit のグループのものである。

平均値や中央値から推測した、試料の D ダイマーレベルはプール試料 1 とプール試料 4 が同程度であり、希釈試料 1 とプール試料 2 とプール試料 3 が同程度であった。

DD　unit グループの CV %は D ダイマーレベルに依存せず、全体が 20 %を超え、一番 D ダイマーレベルが高いと推測されたプール試料 5 の CV %が 31.9 と一番大きな値を示した。
FE　unit グループも類似の傾向を示し、全体的に CV%が 10 前後の値を示し、高値レベルのプール試料 5 は他のレベルより高めの 15.58 であった。RANGE も高値レベルのプール試料 5 で最も大きな値を示した。

80 検体で作製したプール試料と 20 検体で作製したプール試料を比較すると、試料の RANGE は DD　unit では 80 検体で作製したプールが小さく、FE　unit では 20 検体のプールが小さい結果であった。

個別試料 16 検体についても 2 つのグループで集計し、それぞれ表 6 と 7 にまとめた。
DD　unit グループの中でも試薬によって測定値の高低が生じた。個別試料を高めに測定する試薬は、表 4 のプール試料で高値であった試薬とほぼ一致した。

表4. Dダイマー　ヒト由来試料測定値-1 (プール)　　DD unit　　μg/mL

	ヒト由来試料　1) 80検体のプール					ヒト由来試料　2) 20検体のプール			
試薬	プール試料1	希釈試料1	希釈試料2	希釈試料3	希釈試料4	プール試料2	プール試料3	プール試料4	プール試料5
1	8.85	4.65	2.40	1.25	0.45	5.00	5.75	8.70	19.00
2	10.50	5.80	3.15	1.85	1.30	5.95	7.65	10.80	23.10
3	6.21	3.56	2.08	1.25	0.72	3.29	3.89	5.39	11.31
4	8.63	5.03	2.97	1.77	1.20	5.00	5.83	8.33	17.13
5	9.83	5.36	3.04	1.90	1.17	5.40	6.38	8.78	18.13
6	7.50	3.91	2.23	1.42	1.07	4.17	4.97	7.33	13.61
7	6.94	3.46	1.90	1.15	0.93	3.01	3.89	5.95	7.55
8	5.46	3.09	1.73	1.11	0.84	3.07	3.63	5.00	10.63
9	9.64	5.01	2.71	1.59	1.01	5.74	6.02	8.45	15.97
平均値	**8.17**	**4.43**	**2.47**	**1.48**	**0.96**	**4.51**	**5.33**	**7.64**	**15.16**
中央値	**8.63**	**4.65**	**2.40**	**1.42**	**1.01**	**5.00**	**5.75**	**8.33**	**15.97**
SD	1.739	0.952	0.523	0.308	0.266	1.161	1.349	1.888	4.833
CV%	21.3	21.5	21.2	20.9	27.5	25.7	25.3	24.7	31.9
min	5.46	3.09	1.73	1.11	0.45	3.01	3.63	5.00	7.55
max	10.50	5.80	3.15	1.90	1.30	5.95	7.65	10.80	23.10
RANGE	**5.04**	**2.71**	**1.42**	**0.78**	**0.85**	**2.95**	**4.02**	**5.80**	**15.55**

表6. Dダイマー　個別試料16検体　　DD unit　　μg/mL

試薬	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
1	1.60	1.25	2.00	1.50	2.15	1.85	1.50	0.50	1.45	2.05	1.10	1.05	0.65	0.50	1.00	1.30	
2	2.05	2.10	2.75	2.15	2.60	2.50	2.50	1.30	2.05	2.60	1.40	1.10	1.05	0.85	1.70	1.80	
3	1.38	1.45	1.81	1.48	1.56	1.76	1.46	0.80	1.49	1.76	0.81	0.79	0.72	0.56	0.76	1.04	
4	2.03	2.20	2.80	2.20	2.40	2.73	2.33	1.20	2.07	2.47	1.33	1.10	1.07	0.85	1.47	1.47	
5	2.11	2.14	2.79	2.16	2.34	2.49	2.23	1.26	2.10	2.56	1.45	1.25	1.21	0.90	1.51	1.66	
6	1.63	1.53	1.90	1.66	1.84	1.75	1.59	1.03	1.46	1.56	1.11	1.21	0.89	0.82	1.12	1.44	
7	1.46	1.52	1.86	1.64	1.89	1.52	1.79	0.79	1.35	1.38	0.98	0.81	0.77	0.62	1.07	0.75	
8	1.28	1.43	1.50	1.15	1.43	1.56	1.26	0.89	1.21	1.56	0.78	0.89	0.74	0.63	0.92	1.08	
9	1.56	1.44	2.04	1.91	3.77	1.57	1.80	0.88	1.89	1.31	0.96	1.57	0.79	0.73	1.00	1.46	
平均値	**1.68**	**1.67**	**2.16**	**1.76**	**2.22**	**1.97**	**1.83**	**0.96**	**1.67**	**1.92**	**1.10**	**1.09**	**0.88**	**0.72**	**1.17**	**1.33**	
中央値	**1.60**	**1.52**	**2.00**	**1.66**	**2.15**	**1.76**	**1.79**	**0.89**	**1.49**	**1.76**	**1.10**	**1.10**	**0.79**	**0.73**	**1.07**	**1.44**	
SD	0.309	0.365	0.489	0.365	0.699	0.471	0.433	0.262	0.349	0.518	0.246	0.245	0.191	0.145	0.315	0.330	
CV%	18.4	21.9	22.6	20.7	31.5	23.9	23.7	27.2	20.9	27.0	22.4	22.6	21.8	20.2	26.9	24.8	
min	1.28	1.25	1.50	1.15	1.43	1.52	1.26	0.50	1.21	1.31	0.78	0.79	0.65	0.50	0.76	0.75	
max	2.11	2.20	2.80	2.20	3.77	2.73	2.50	1.30	2.10	2.60	1.45	1.57	1.21	0.90	1.70	1.80	平均値
RANGE	**0.83**	**0.95**	**1.30**	**1.05**	**2.34**	**1.22**	**1.24**	**0.80**	**0.89**	**1.29**	**0.67**	**0.78**	**0.56**	**0.40**	**0.95**	**1.06**	**1.02**

表7. Dダイマー　個別試料16検体　　FE unit　　μg/mL

試薬	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
10	1.06	1.16	1.39	1.05	1.18	1.28	1.10	0.66	1.05	1.31	0.67	0.54	0.51	0.41	0.73	0.77	
11	1.15	1.25	1.24	1.05	1.32	1.26	1.11	0.68	1.07	1.21	0.68	1.08	0.56	0.57	0.74	1.28	
12	0.91	0.98	1.01	1.05	1.13	0.84	0.87	0.57	1.04	0.83	0.56	1.08	0.50	0.49	0.62	0.98	
13	0.75	0.65	1.07	0.81	1.28	0.64	0.84	0.31	0.79	0.64	0.45	0.38	0.37	0.23	0.45	0.31	
平均値	**0.96**	**1.01**	**1.18**	**0.99**	**1.22**	**1.00**	**0.98**	**0.55**	**0.99**	**1.00**	**0.59**	**0.77**	**0.48**	**0.42**	**0.63**	**0.83**	
中央値	**0.98**	**1.07**	**1.15**	**1.05**	**1.23**	**1.05**	**0.98**	**0.62**	**1.04**	**1.02**	**0.61**	**0.81**	**0.50**	**0.45**	**0.67**	**0.87**	
SD	0.175	0.263	0.172	0.119	0.087	0.318	0.145	0.170	0.129	0.315	0.109	0.361	0.080	0.145	0.133	0.406	
CV%	18.19	26.02	14.65	12.07	7.09	31.63	14.80	30.69	13.04	31.65	18.48	47.11	16.67	34.30	20.88	48.71	
min	0.75	0.65	1.01	0.81	1.13	0.64	0.84	0.31	0.79	0.64	0.45	0.38	0.37	0.23	0.45	0.31	
max	1.15	1.25	1.39	1.05	1.32	1.28	1.11	0.68	1.07	1.31	0.68	1.08	0.56	0.57	0.74	1.28	平均値
RANGE	**0.40**	**0.60**	**0.39**	**0.24**	**0.19**	**0.64**	**0.28**	**0.37**	**0.27**	**0.67**	**0.23**	**0.70**	**0.19**	**0.34**	**0.29**	**0.97**	**0.42**

二次標準物質候補品（凍結乾燥品）の測定値について、DD　unit のグループにおける測定値を表 8 に、FE　unit のグループにおける測定値を表 9 に示した。試料は FDP と同じものである。

DD　unit グループにおける、試料 100:0 の測定平均値は 8.55 μg/mL であり、混合比に依存して、順次高値化傾向を示す試薬、低値化傾向を示す試薬、ほとんど変わらない試薬の 3 つのパターンが確認された。混合比に依存して低分子分画の比率が大きくなるに従い、CV %と RANGE が大きくなり、この傾向は FDP と同様であった。

FE　unit グループにおいては DD　unit グループと異なり、混合比に依存して CV %と RANGE が低値化する傾向を示した。

表8. Dダイマー　二次標準品候補物質　DD unit　μg/mL

試薬	凍結乾燥品				
	100:0	100:1	100:2	100:4	100:10
1	8.30	8.80	8.90	8.45	8.65
2	10.95	11.85	11.65	11.25	11.85
3	5.85	5.97	5.95	5.89	6.02
4	11.07	11.20	11.10	10.90	10.83
5	9.94	9.93	9.93	10.07	10.43
6	9.84	10.94	11.98	13.94	19.95
7	8.62	8.87	8.79	9.56	11.35
8	5.28	5.40	5.35	5.37	5.41
9	7.13	7.98	10.27	8.88	15.46
平均値	**8.55**	**8.99**	**9.32**	**9.37**	**11.11**
中央値	**8.62**	**8.87**	**9.93**	**9.56**	**10.83**
SD	2.115	2.258	2.360	2.659	4.508
CV%	24.7	25.1	25.3	28.4	40.6
min	5.28	5.40	5.35	5.37	5.41
max	11.07	11.85	11.98	13.94	19.95
RANGE	**5.79**	**6.45**	**6.63**	**8.58**	**14.54**

表9. Dダイマー　二次標準品候補物質　FE unit　μg/mL

試薬	凍結乾燥品				
	100:0	100:1	100:2	100:4	100:10
10	5.03	5.15	5.10	5.13	5.15
11	3.23	3.55	3.85	4.25	5.84
12	2.45	2.73	2.98	3.60	5.84
13	8.29	8.39	8.50	8.95	9.82
平均値	**4.75**	**4.96**	**5.11**	**5.48**	**6.66**
中央値	**4.13**	**4.35**	**4.48**	**4.69**	**5.84**
SD	2.596	2.502	2.421	2.395	2.131
CV%	54.67	50.50	47.39	43.69	31.99
min	2.45	2.73	2.98	3.60	5.15
max	8.29	8.39	8.50	8.95	9.82
RANGE	**5.84**	**5.66**	**5.51**	**5.35**	**4.67**

７．補正による可能性

昨年度は学会が行なっているHarmonization の手法にてプール試料の収束性を確認したことを報告した。同様の方法を用いて二次標準物質候補品について Harmonization の効果を検討した。今年度は 9 検体のプール試料測定平均値を X 軸とし、各試薬での実測値を Y 軸として、一次回帰式を求め、この一次式を用いて二次標準物質候補品の実測値を補正した。

用いた一次回帰式は表 10 に示した通りで、補正（Harmonization）を行なった後の二次標準物質候補品の値は表 11～13 に示した通りである。

プール試料から導いた一次式にて、二次標準品物質候補品の補正を行なっても、FDP、D ダイマーともに、CV%と RANGE の改善効果はほとんどなかった。この結果は混合比に依らずほぼ同じ結果であった。

表10. 補正に用いた一次式

FDP		
試薬	平均との回帰式	相関係数
1	y=0.9574x+0.5877	0.9940
2	y=0.9389x-0.6099	0.9979
3	y=1.0325x-0.4514	0.9907
4	y=1.0594x-0.3634	0.9981
5	y=0.9948x+1.3471	0.9991
6	y=0.9662x+0.2412	0.9980
7	y=0.9330x-0.6122	0.9963
8	y=1.0117x-0.2288	0.9974
9	y=1.0914x+0.2782	0.9983
Dダイマー　DD　unitグループ		
試薬	平均との回帰式	相関係数
1	y=1.2838x-0.9257	0.9981
2	y=1.5219x-0.6917	0.9963
3	y=0.7336x-0.0991	0.9986
4	y=1.1069x-0.0422	0.9989
5	y=1.1861x-0.0540	0.9996
6	y=0.8974x+0.1330	0.9992
7	y=0.5209x+0.9606	0.9292
8	y=0.6857x+0.0182	0.9988
9	y=1.0635x+0.3102	0.9964
Dダイマー　FE　unitグループ		
試薬	平均との回帰式	相関係数
10	y=1.1428x-0.2614	0.9955
11	y=0.9934x+0.2521	0.9959
12	y=0.7622x+0.4092	0.9938
13	y=1.1016x+0.3999	0.9979

表11. FDP　二次標準候補物質候補物質　補正値　μg/mL

	凍結乾燥品				
試薬	100:0	100:1	100:2	100:4	100:10
1	15.6	16.5	18.8	21.3	30.6
2	11.3	11.8	11.5	11.4	11.7
3	12.9	12.7	12.6	12.6	12.5
4	10.3	11.6	13.1	15.8	26.0
5	7.2	7.3	7.2	7.4	7.4
6	8.7	9.7	10.9	12.8	19.4
7	11.4	10.9	11.3	11.2	11.5
8	10.3	11.5	12.5	14.7	23.5
9	16.7	18.0	22.0	19.4	30.9
平均値	11.6	12.2	13.3	14.1	19.3
中央値	11.3	11.6	12.5	12.8	19.4
SD	3.06	3.27	4.43	4.30	8.88
CV%	26.4	26.8	33.3	30.5	46.0
min	7.2	7.3	7.2	7.4	7.4
max	16.7	18.0	22.0	21.3	30.9
RANGE	**9.5**	**10.7**	**14.8**	**13.9**	**23.5**

表12. Dダイマー　二次標準品候補物質　補正後　　μg/mL

試薬	凍結乾燥品				
	100:0	100:1	100:2	100:4	100:10
1	7.19	7.58	7.65	7.30	7.46
2	7.65	8.24	8.11	7.85	8.24
3	8.11	8.28	8.24	8.16	8.34
4	10.04	10.16	10.07	9.89	9.82
5	8.42	8.42	8.42	8.53	8.84
6	10.81	12.04	13.20	15.39	22.08
7	14.69	15.18	15.02	16.50	19.94
8	7.67	7.85	7.77	7.80	7.87
9	6.42	7.21	9.37	8.06	14.24
平均値	**9.00**	**9.44**	**9.76**	**9.94**	**11.87**
中央値	**8.11**	**8.28**	**8.42**	**8.16**	**8.84**
SD	2.537	2.624	2.622	3.488	5.584
CV%	28.2	27.8	26.9	35.1	47.0
min	6.42	7.21	7.65	7.30	7.46
max	14.69	15.18	15.02	16.50	22.08
RANGE	**8.28**	**7.98**	**7.37**	**9.20**	**14.62**

表13. Dダイマー　二次標準品候補物質　補正後　　μg/mL

試薬	凍結乾燥品				
	100:0	100:1	100:2	100:4	100:10
10	4.63	4.73	4.69	4.72	4.73
11	3.00	3.32	3.62	4.02	5.62
12	2.68	3.05	3.38	4.18	7.13
13	7.15	7.25	7.35	7.75	8.54
平均値	**4.36**	**4.59**	**4.76**	**5.17**	**6.51**
中央値	**3.81**	**4.02**	**4.16**	**4.45**	**6.37**
SD	2.048	1.923	1.815	1.747	1.680
CV%	46.93	41.92	38.14	33.80	25.83
min	2.68	3.05	3.38	4.02	4.73
max	7.15	7.25	7.35	7.75	8.54
RANGE	**4.48**	**4.20**	**3.97**	**3.73**	**3.81**

８．考察

学会が先行してきた Harmonization の結果を保持するための二次標準物質を作製すべく活動を行なってきた。

血漿 FDP においては、ヒト由来のプール試料で、昨年度と今年度のは 10～20 %程度の CV %を示し、ある程度の収束性を示した。しかし作製した二次標準物質候補品については昨年度作製品､今年度作製品ともにヒト由来のプール試料より大きな CV%と RANGE を示し､Harmonization によっても収束するに至らなかった。

D ダイマーにおいては、昨年度は高値に分布する試薬群（多くが DD　unit）と低値に分布す

る試薬群（多くがFE　unit）に分けて集計し、今年度はDD　unit群とFE　unit群の2つのグループに分けて集計した。昨年度、今年度ともにヒト由来プール試料の実測値は収束性を示さなかった。昨年度はHarmonization によってヒト由来プール試料で、ある程度の収束性を回復することできたが、二次標準物質候補品では収束しなかった。そして今年度も作製した二次標準物質候補品について、ヒト由来プール試料から導いた一次式を用いた補正を施したが、Harmonization を行なっても収束性を得ることはできなかった。

FDPについて、昨年度実施した従来の半定量法（FDP Lテスト）でのヒト由来プール試料の測定値と二次標準物質候補品の測定に参加した血漿 FDP 測定試薬の測定値の関係は良好であり、全ての血漿 FDP 測定試薬の測定値が半定量法の値に適合した。今年度は血漿試料を用いたこともあり、半定量法での測定を実施していないが、参加した血漿 FDP 測定試薬においてははずれ値を示すものがなく比較的収束した結果であった。特にカットオフ付近の試料ではずれ値がないことから、二次標準物質候補品の設定を行なわなくてもヒト由来プール試料によるサーベイ等の実施が、今後の試薬間差管理の有効な手段となり得る可能性が示唆された。この場合には2あるいは3濃度の試料での管理が望ましいと考える。

D ダイマーについて、昨年度と今年度の参加試薬数が異なり、参加試薬数によって平均値や中央値が異なることは今後も起こり得る事象である。またDダイマーはFDPと異なる項目特性を考慮すると、試薬間の是正は必要であり、その方法は諸事情を反映したものであることが望ましいと考える。

３．研究発表、講演等の状況

・標準化セミナーでの講演

NEDO 基本検討委員会―平成 18 年度の成果―

（2007 年度 特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会(JCCLS)学術集会、2007 年 8 月、東京）

司会：濱崎　直孝

平成 18 年度基本検討委員会活動概要・・・・ 藤橋　和夫

純物質系標準物質の研究開発の成果・・・・・高津　章子

実試料系の成果報告・・・・・・・・・・・・・桑　克彦

・その他講演等

１．桑　克彦： 2008 年新健診における検査のポイント：糖尿病関連・高脂血症関連．平成 18 年度茨城県臨床衛視枝検査技師会臨床化学分野精度管理報告会、水戸、2007．資料集 ：1-11, 2007.

２．桑　克彦： HbA1c 測定の精度管理と標準化の最新情報．第 74 回新潟県臨床検査センター協議会総会・研修会、新潟、2007．資料集 ：1-10, 2007.

３.桑　克彦:糖尿病検査の最近の話題:HbA1c 測定の精確さの確保と SMBG 測定のピットフォール、メタボリックシンドローム健診検査のポイント．デタミナーL HbA1c 発売記念学術講演会、大阪、2007．資料集 ：1-12, 2007.

４.桑　克彦:糖尿病検査の最近の話題:HbA1c 測定の精確さの確保と SMBG 測定のピットフォール、メタボリックシンドローム健診検査のポイント．デタミナーL HbA1c 発売記念学術講演会、東京、2007．資料集 ：1-12, 2007.

５.桑　克彦:糖尿病検査の最近の話題:HbA1c 測定の精確さの確保と SMBG 測定のピットフォール、メタボリックシンドローム健診検査のポイント．デタミナーL HbA1c 発売記念学術講演会、札幌、2007．資料集 ：11-12, 2007.

６.桑　克彦:糖尿病検査の最近の話題:HbA1c 測定の精確さの確保と SMBG 測定のピットフォール．日本医学検査学会、宮崎、2007．資料集 ：11-12, 2007.

７．桑　克彦：HbA1c 測定の最近の話題と特定健診の検査概要．2007 年筑波臨床化学セミナー、つくば、2007．テキスト：1-12, 2007.

８．桑　克彦：国内外における標準化の動向と将来．日本臨床衛生検査技師会平成 19 年度生物化学分析部門研修会、岐阜、2007．テキスト：1-16, 2007.

９．桑　克彦：外部精度管理調査事業の今後の展開について―行政関係．第 46 回中部医学検査学会、大垣、2007．第 46 回中部医学検査学会抄録集：51.

・研究発表

１．桑　克彦： HbA1c 測定の総合的な不確かさ評価の手順と基準．第 26 回日本臨床化学会夏期セミナー、志摩、2007．臨床化学 36（Supp.1）：83-86, 2007.

２．桑　克彦：測定の標準システムに関する国際規格．第 26 回日本臨床化学会夏期セミナー、志摩、2007．臨床化学 36（Supp.1）：147-150, 2007.

３．桑　克彦： NEDO 臨床検査用標準物質の研究開発：実試料系の成果報告．第 21 回日本臨床検査標準協議会学術集会、東京、2007.

４．斉藤友幸、白井秀明、加藤隆則、桑　克彦：特定健康診査における検体の取り扱い：Part 1 健診受診前の食事の影響．日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、横浜、2007．日本臨床検査自動化学会会誌　32（4）：425, 2007.

５．白井秀明、斉藤友幸、加藤隆則、桑　克彦：特定健康診査における検体の取り扱い：Part２ 検体採取から遠心分離までの放置時間．日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、横浜、2007．日本臨床検査自動化学会会誌　32（4）：426 2007.

６．渡辺真博、飯塚儀明、谷中里美、桑　克彦、川上　康：特定健康診査（メタボリックシンドローム健診）項目における不確かさ：酵素活性項目　AST, ALT, GGT．日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、横浜、2007．日本臨床検査自動化学会会誌　32（4）：427, 2007.

７．山下計太、飯塚儀明、加藤隆則、桑　克彦：特定健康診査（メタボリックシンドローム健診）項目における不確かさ：TG, HDL-C, LDL-C,GLU．日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、横浜、2007．日本臨床検査自動化学会会誌　32（4）：428, 2007.

８．加藤隆則、中川　徹、色川正貴、桑　克彦：職域でのメタボリックシンドロームの実態と TG, HDL-C, Glu 測定の不確かさ．日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、横浜、2007．日本臨床検査自動化学会会誌　32（4）：429, 2007.

９．飯塚儀明、加藤隆則、白井秀明、斉藤友幸、桑　克彦：隠れ糖尿病、隠れ高脂血症のスクリーニングのための食事負荷：テストミール A による血液生化学成分の変化．日本臨床検査自動化学会第 39 回大会、横浜、2007．日本臨床検査自動化学会会誌　32（4）：430, 2007.

10. 桑　克彦：外部精度管理調査事業の今後の展開について―行政関係．第 46 回中部医学検査学会、大垣、2007．第 46 回中部医学検査学会抄録集：51.

11. K. Kuwa： Matrix reference materials for ionized calcium and blood gases measurements. 11th Asian Pacific Congress of Clinical Biochemistry、Beijing、2007．Chinese Medical Journal 120(Suppl.2):23-24, 2007.

12. K. Kuwa, S. Hosokaya, W. Tani, M. Tominaga and T. Hoshino： Estimate procedure and criteria for acceptable performance of uncertainty on hemoglobin A!C measurement. 11th Asian Pacific Congress of Clinical Biochemistry、Beijing、2007．Chinese Medical Journal 120(Suppl.2):246, 2007.

13. Katsuhiko Kuwa, Yasushi Takagi, Naotaka Hamasaki, Koichi Chiba andHideaki Imai： Proficiency testing activities at JCCLS using human pooled serum and matrix reference materials in laboratory medicine.11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, Tsukuba, 2007. Abstracts:WE-B03, 2007

14. Katsuhiko Kuwa, Toshiharu Fukunaga and Wataru Tani：Development of matrix reference material for blood gas analysis and their external quality assessment.11th

International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, Tsukuba, 2007. Abstracts:P-53, 2007

15. Katsuhiko Kuwa, Shigemi Hosokaya, Wataru Tani, Makoto Tominaga and Tadao Hoshino：Estimate procedure and criteria for acceptable performance of uncertainty on hemoglobin A!C measurement.11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials, Tsukuba, Oct. 2007. Abstracts:P-63, 2007
16. 武井　泉、谷　渉、岡橋美貴子、高妻卓司、石橋みどり、安川恵子、梅本雅夫、桑　克彦、中山年正、谷口嘉之、渡部直美、小野佳一、星野忠夫、富永真琴：グリコアルブミン(GA)の標準化の現況．第 54 回日本臨床検査医学会学術集会・第 47 回日本臨床化学会年次学術集会連合大会、大阪、2007．臨床病理　55（補）：285.
17. 飯塚儀明、加藤隆則、白井秀明、斉藤友幸、桑　克彦：隠れ糖尿病、隠れ高脂血症のスクリーニングのための食事負荷―テストミール A による血液生化学成分の変化―．第 54 回日本臨床検査医学会学術集会・第 47 回日本臨床化学会年次学術集会連合大会、大阪、2007．臨床病理　55（補）：340.
18. 加藤 愛、加藤　尚志、惠山 栄、高津　章子：同位体希釈質量分析法（ID/MS）を用いたアミノ酸分析法の開発，日本分析化学会第 56 年会，徳島、2007/09/21
19. Megumi Kato, Sakae Eyama, Mika Saeki, Tomoya Kinumi, Akiko Takatsu: Development of C-reactive protein CRM, 11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials (BERM 11), Tsukuba, October 2007.
20. Migaku Kawaguchi, Hisashi Kato, Akiko Takatsu: Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry for Determination of Cortisol in Human Serum, 11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials (BERM 11), Tsukuba, October 2007.
21. Hisashi Kato, Migaku Kawaguchi, Akiko Takatsu ： Simultaneous Quantitative Determination of Cortisol and Progesterone in Human Serum Using Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, 11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials (BERM 11), Tsukuba, October 2007
22. 加藤 愛, Development of C-reactive Protein Standard Solution, PITTCON2008, New Orleans, USA、March, 2008.
23. Takashi Yamato, Takashi Kobayashi, Hisao Tsukamoto:Progress Report from the Japan Association of Clinical Reagents Industries on Research and Development of Reference Material for Clinical Laboratory, 11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials (BERM 11), Tsukuba, October 2007.
24. Hideo Misaki: Development of Reference Materials and Reference Method on the Albumin Measurement, 11th International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials (BERM 11), Tsukuba, October 2007.

・論文投稿

1．桑　克彦：健診・保健指導による健康増進―標準化の動き．臨床病理　55(9)：749-756, 2007.

2．富永真琴、桑　克彦、星野忠夫、中山年正、渥美義仁、雨宮　伸、高加国夫、須郷秋恵、永峰康孝：HbA1c 測定のためのレファレンスラボラトリー設定指針．臨床化学 36(1):67-73, 2007.

3．富永真琴、渥美義仁、雨宮　伸、五十嵐雅彦、石橋みどり、梅本雅夫、岡橋美貴、桑　克彦、高加国夫、三家登喜夫、須郷秋恵、武井　泉、永峰康孝、宮下徹夫：ADA、EASD、IFCC、IDF によるヘモグロビン A1c 測定の国際標準化に関するコンセンサス・ステートメントに対する糖尿病関連指標専門委員会の見解．臨床化学 36(4):310-313, 2007.

・解説等

1．桑　克彦：糖尿病検査の標準化．検査と技術　35(8)：749-756，2007.

2．桑　克彦：診断技術の進歩に貢献する分析技術―診断における臨床検査値の信頼性．ぶんせき　2007 年第 10 号：537-542,2007.

3．桑　克彦:概論 トレーサビリティと不確かさ. クリニカルラボのための不確かさマニュアル、関東化学、24-33, 2007.

4．桑　克彦：不確かさを用いた新しい精度管理の方法．Nissui Technomedia 6:28-46, 2007.

5．桑　克彦:糖尿病診断の最近の話題　HbA1c 測定の JDS 標準化（１）測定体系．Medical Test Journal 1006 号:6, 2007.

6．桑　克彦：糖尿病診断の最近の話題　HbA1c 測定の JDS 標準化（２）日常検査法の性能保証．Medical Test Journal 1008 号: 5 , 2007.

7．桑　克彦:糖尿病診断の最近の話題　HbA1c 測定の JDS 標準化（３）信頼性の評価．Medical Test Journal 1011 号: 5 , 2007.

４．謝　辞

本研究は（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）が支援する知的基盤創成・利用促進研究開発事業として行われたものである。NEDO 主催の本事業により、臨床検査の標準化に携わる多数の研究機関、臨床検査薬メーカー、臨床化学研究者、試薬メーカー技術者、計量標準研究者が集結して「臨床検査用標準物質の研究開発」の研究を推進できたことは非常に意義深い。さらに本研究が医療における安心・安全に大きく寄与することができ、もって今後の国民医療への多大な貢献が期待されるものである。

なお、本研究の実施に当たり、特に調査研究において健康人および患者様の試料のご提供にご協力いただきました機関に感謝の意を表します。また、（社）日本臨床検査薬協会および同協会加盟メーカーから貴重なる助言および多大なる協力を得たことに感謝いたします。また、標準物質の候補品の調製およびプロトタイプの設定については、有限責任中間法人検査医学標準物質機構の多大なる協力を得たことに感謝いたします。

（契約管理番号　07002656-0）

平成 19 年度成果報告

知的基盤創成・利用促進研究開発事業
臨床検査用標準物質の開発

平成 20 年 5 月

作　成　　独立行政法人　新エネルギー・産業技術総合開発機構
神奈川県川崎市幸区大宮町 1310
ミューザ川崎セントラルタワー20F
TEL 044-520-5175　　FAX 044-520-5177

委託先　　独立行政法人　産業技術総合研究所
茨城県つくば市梅園 1-1-1
TEL 029-861-4100　　FAX 044-861-4100